

Tesis de Posgrado

Drogas inhibidoras de la multiplicación del virus Junín

León, Marta Esther Lucrecia

1978

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

León, Marta Esther Lucrecia. (1978). Drogas inhibidoras de la multiplicación del virus Junín. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1548_Leon.pdf

Cita tipo Chicago:

León, Marta Esther Lucrecia. "Drogas inhibidoras de la multiplicación del virus Junín". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1978.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1548_Leon.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

NAL

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"DROGAS INHIBIDORAS DE LA MULTIPLICACION DEL VIRUS JUNIN"

AUTOR : Marta Esther Lucrecia León

DIRECTOR : Dra Celia Esther Coto de Ravaschino

LUGAR DE TRABAJO : Cátedra de Virología

Departamento de Química Biológica

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN

CIENCIAS QUIMICAS

1
2
3

Dedico este trabajo de investigación a...

mi esposo, mis hijos, mi madre...

la Dra Celia E. Coto de Ravaschino...

y a mis compañeros de laboratorio Dra Elsa Damento, Lics Guillermina Help, Susana Mersich, Susana V. García Franco, Cristina D'Aiutulo y Sr Jorge Lampuri.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Celia E.Coto de Ravaschino por su inapreciable dirección, apoyo y estímulo que permitió la realización de este trabajo.

A los Dres Rubén P.Laguens y Liliana Martínez Peralta por su colaboración en la ejecución e interpretación de los estudios de microscopía electrónica y fluorescencia.

A la Dra Mercedes Weissenbacher y colaboradores por su desinteresada colaboración y constante estímulo.

A la Dra Ana M.Brunengo, Lics Ernesto J.Massouh y Ana M.Díaz Primavera por su apoyo y colaboración.

I N D I C E

INTRODUCCION.....	1
DROGAS ANTIVIRALES.....	1
Generalidades.....	1
Propiedades.....	2
Criterios de selección.....	3
Ensayo de antivirales.....	5
ANTIVIRALES EN USO.....	5
DROGAS NO EstrictAMENTE ANTIVIRALES.....	8
DROGAS ANTIVIRALES ENSAYADAS EN ARENAVIRUS.....	12
FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA.....	14
OBJETIVOS.....	16
MATERIALES Y METODOS.....	18
Cultivos celulares.....	18
Virus.....	18
Preparación de stocks.....	19
Compuestos químicos.....	19
Drogas radiactivas.....	20
Determinación de la infectividad.....	21
Titulación por observación de la ACP.....	21
Titulación por unidades formadoras de placas.....	21
Reacción de neutralización.Preparación de inmunosuero	22
Ensayo de neutralización.....	23
Microscopía de fluorescencia.....	24

Microscopía electrónica.....	25
Pureza de los compuestos.....	25
Determinación del poder rotatorio.....	25
Ensayo de glucosaminas de distinto origen.....	26
Análisis por absorción atómica.....	26
Toxicidad.Determinación de la concentración óptima..	29
Determinación de la viabilidad.....	29
Esquema de detección de la actividad antiviral.....	30
Efecto sobre la replicación viral.....	30
Efecto sobre el rendimiento viral.....	31
Curvas de crecimiento.....	31
Efecto sobre las macromoléculas.....	32
Incorporación de uridina.....	32
Incorporación de metionina.....	33
Animales de laboratorio.....	33

RESULTADOS

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRUS JUNÍN IN VITRO DE: AMANTADINA, RIMANTADINA, 2-DEOXI-D-GLUCOSA, BI Y GLUCOSAMINA.

Toxicidad de los compuestos.....	34
Efecto sobre la replicación viral.....	38
Efecto sobre el rendimiento viral.....	41
Curva de crecimiento del virus Junín.....	44
Acción del BI, glucosamina y 2-deoxi-D-glucosa sobre la síntesis de virus asociado a las células.....	49

Indices quimioterápicos.....	50
PARTE II MECANISMO DE ACCION DE LA GLUCOSAMINA	
Efecto unitario o específico.....	51
Acción sobre distintas cepas de virus.....	52
Determinación de la etapa más vulnerable a la acción de la glucosamina. Ensayo in-vitro.....	53
Pretratamiento de los cultivos.....	53
Etapas del ciclo viral sobre la que actúa.....	54
Efecto después de varios ciclos.....	55
Reversibilidad del efecto.....	59
Cinética de reversibilidad.....	59
Estabilidad de las estructuras.....	66
Síntesis de macromoléculas del huésped.....	67
Acción sobre la síntesis de antígeno viral y producción de partículas físicas.....	73
Síntesis de antígenos virales	76
Formación de partículas físicas.....	83
PARTE III ACCION DE LA GLUCOSAMINA SOBRE ARENAVIRUS	
Virus Tacaribe.....	85
Virus Pichindé.....	89
PARTE IV ACCION DEL BI Y GLUCOSAMINA IN VIVO	
Selección del huésped apropiado.....	90
BI. Toxicidad para ratones.....	93
Administración a ratones infectados con Tacaribe.....	93
Administración a ratones infectados con Junín.....	95

Glucosamina.Toxicidad para ratones.....	100
Administración a ratones inoculados con Tacaribe.....	100
Administración a ratas inoculadas con Junín.....	101
DISCUSION	
ANALISIS COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRUS JUNIN DE DIFERENTES COMPUESTOS.....	102
MECANISMO DE ACCION DE LA GLUCOSAMINA.....	106
ADMINISTRACION DE BI Y GLUCOSAMINA IN VIVO.....	114
CONCLUSIONES.....	116
REFERENCIAS.....	117

ABREVIATURAS

TIQ	: índice quimioterápico
ADN	: ácido desoxiribonucleico
ARN	: ácido ribonucleico
LCM	: virus de la Coriomeningitis Linfocitaria
VSV	: virus de Estomatitis Vesicular
NDV	: virus de la Enfermedad de Newcastle
BI	: sal soluble del (S,S)1,2-bis(5 metoxi-2-benzimidazolil-1-2-etandiol).
UFP	: unidades formadoras de placas
ACP	: acción citopatógena
PBS	: buffer salino fosfato
DICT50	: dosis infectante cultivo de tejido cincuenta
DL50	: dosis letal cincuenta
$[\alpha]$: poder rotatorio
ug/ml	: microgramos por mililitro
mM	: milimolar
pH	: logaritmo de la concentración de hidrógeno
log.	: logaritmo en base diez.
hs pi	: horas post infección.
C	: grados centígrados
ppm	: partes por millón
CPM	: cuentas por minuto
ic	: inoculación intracerebral
ip	: inoculación intraperitoneal

I N T R O D U C C I O N

D R O G A S A N T I V I R A L E S

GENERALIDADES

Se conocen dos formas de combatir y controlar las enfermedades de etiología viral, una es mediante el uso de vacunas y la otra a través del empleo de drogas antivirales.

La experiencia con vacunas, que se remonta a la época de Jenner creador de la vacuna antivariólica, demuestra que es posible combatir eficazmente algunas enfermedades como por ejemplo poliomielitis en la cual reduce notablemente su incidencia o bien logrando su erradicación, como es el caso reciente de la viruela.

A pesar de estos logros, se conocen virus que por su alta incidencia mutagénica, como Influenza, o por ser sospechosos o estar involucrados en la producción de enfermedades crónicas no es posible obtener vacunas adecuadas. Por otro lado, las vacunas carecen de valor terapéutico por lo que el desarrollo de una quimioterapia específica antiviral debería ser de primordial importancia.

Se sabe del éxito de los antibióticos en la lucha contra las enfermedades bacterianas, sin embargo a pesar de las centenares de investigaciones realizadas hasta el presente sólo se han logrado unos pocos antivirales eficaces.

El escaso éxito de las drogas antivirales se debe esencialmente a

tres factores; el principal es la dependencia de los virus con los procesos metabólicos de la célula huésped, de modo que la mayoría de los quimiotrónicos en concentraciones virucidas, es decir cuando bloquean una etapa de la replicación viral producirán inevitablemente la muerte de las células parasitadas y de las otras que no lo están. El segundo factor está relacionado con el desencadenamiento de la enfermedad ya que cuando se reconocen las enfermedades virales por sus síntomas y en el mejor de los casos por diagnóstico de laboratorio, el virus ya se ha distribuido a todo el organismo. Por último la aparición de mutantes como ocurre normalmente con las bacterias, aunque en este caso no tan frecuente, salvo para algunos virus como ser polio.

PROPIEDADES

Para que una droga sea considerada antiviral debe presentar las siguientes características :

- .-Poseer un buen índice quimioterápico(IQ), el cual se define como la relación entre la mínima concentración virucida y la máxima no tóxica
- .-Ser no-polar para facilitar el transporte a través de las membranas biológicas.
- .-Soluble completamente a pH fisiológico o a un pH cercano a él.
- .-Estable químicamente en solución.
- .-Estable metabólicamente en el organismo.
- .-De fácil preparación, rentable y económico.

Además de satisfacer todos estos requisitos el compuesto no debe ser:

- .-Incorporado al ADN de las células no infectadas.

- ..-Un agente inmunosupresor.
- ..-Un agente activador de la replicación viral.
- ..-Teratogénico.
- ..-Carcinogénico o mutagénico.

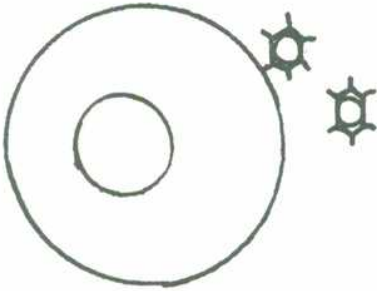
CRITERIOS DE SELECCION

La replicación viral comprende una serie de etapas comunes a todos los virus que conducen a la formación de nuevos virus. Este proceso se puede dividir en adsorción, penetración, eclipse (durante el cual tiene lugar la síntesis del ácido nucléico, de las proteínas, enzimas y todos los constituyentes del virus), luego prosigue la maduración y el ensamble de las diferentes estructuras para finalizar en la liberación de viriones al extracelular.

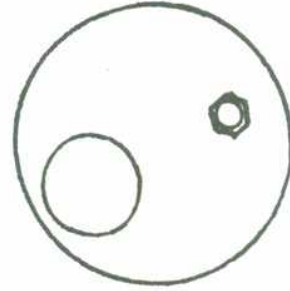
Un antiviral ideal sería cualquier droga capaz de bloquear específicamente uno de estos estadios sin afectar la maquinaria celular.

La selección lógica de un antiviral se realiza entonces teniendo en cuenta el efecto del mismo sobre una etapa vital del ciclo de multiplicación viral.

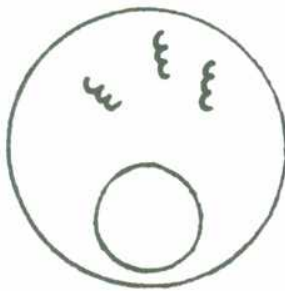
ETAPAS DEL CICLO DE MULTIPLICACION VIRAL



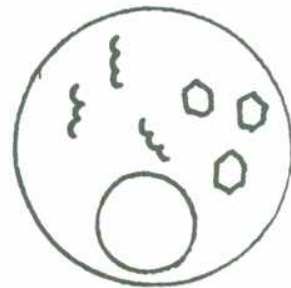
ADSORCION



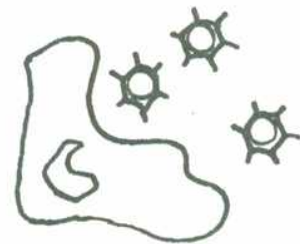
PENETRACION



SINTESIS



ENSAMBLE



LIBERACION

ENSAYO DE ANTIVIRALES

El ensayo de una droga como antiviral comprende tres procesos de experimentación diferentes. El primero de ellos es la evaluación de la actividad antiviral en cultivos celulares (in-vitro), determinando las condiciones de máxima inhibición que dependerán del sistema virus-célula utilizado. Finalizado el estudio in-vitro, el compuesto se prueba en diversos animales de laboratorio (in-vivo). Para cada huésped se determina el índice quimioterápico y las condiciones del tratamiento más adecuado. Los parámetros a establecer son las dosis efectivas no tóxicas, el tiempo y la vía de administración.

Una droga se la utilizará como quimioterápico en el tratamiento de las enfermedades humanas de origen viral después de demostrar su eficacia en voluntarios.

Numerosos compuestos poseen un adecuado índice quimioterápico in-vitro pero fracasan al utilizarlos in-vivo. Muchas veces la causa es una excesiva toxicidad por la cual no sólo no protege a los animales sino que acelera el proceso infeccioso. En muy pocos casos aunque el ensayo en animales dé negativo la droga puede resultar activa en el humano.

ANTIVIRALES EN USO

De las cientos de drogas ensayadas sólo unas pocas son de aplicación efectiva en la terapéutica de las enfermedades humanas. Los análogos de la timidina tales como la 5-iododeoxiuridina o el arabinósido de citosina que inhiben la síntesis de ADN viral, sólo se usan con éxito en el tratamiento localizado del herpes ocular, ya que estos tipos de compues-

tos resultarían sumamente tóxicos si se los utilizara en el tratamiento de una enfermedad generalizada. Otros compuestos de aplicación en los seres humanos son la amantadina, la rimantadina, los tiosemicarbazonas y los bencimidazoles.

La amantadina (adamantamina-ClH)¹ es un compuesto ampliamente probado en la prevención de las enfermedades de origen vírico. Este compuesto presentó una significativa actividad antiviral frente a la infección con virus Influenza tipo A(1), Parainfluenza tipo 1 (Sendai)(2), Seudorrabia(2), Rubeola(3), Flow plague(4), Sarcoma de Rous y de Ersh(5), LCM(6), Junín(7) (8), Tacaribe, Pichindé y Tamiami(9).

El mecanismo de inhibición, de acuerdo al trabajo de Kato y col.(4), lo ejerce a nivel de decapsidación pero no en la etapa de penetración como había sido postulado para el virus Influenza (10).

Los estudios clínicos realizados con amantadina indican que es efectiva contra el virus Influenza cepa Hong Kong A₂(11)(12) sin embargo se debe dosificar cuidadosamente ya que si se excede en el tratamiento se producen disturbios en el sistema nervioso central.

Se sintetizaron diversos derivados de la amantadina a fin de lograr alguno de mayor efectividad. Entre ellos la rimantadina (alfa-metil-1-adamantanoamina)² resultó más activa in-vitro(13) e in-vivo(14) que la amantadina. La experimentación en seres humanos se realizó durante brotes epidémicos de Influenza, o en grupos de voluntarios en los cuales se indujo la enfermedad. En ambos casos la rimantadina redujo la intensidad y la duración de la enfermedad(14).

Un compuesto derivado de los tiosemicarbazonas³, la metil-isatin-beta tiosemicarbazona⁴ inhibe la replicación de algunos virus Pox(15), Sarcoma de Rous(16), LCM, Paraná y Pichindé(17)(18). La inhibición la ejerce impidiendo la traducción de los ARN mensajeros tardíos, como consecuencia de este efecto, en presencia de la droga se forman partículas defectivas. El compuesto sirve para prevenir la viruela, se la administra junto con la vacuna en aquellos casos de infección en los que no se puede esperar a la formación de anticuerpos específicos.

El 2-hidroxi-bencil-bencimidazol(HBB)⁵ es uno de los derivados más potentes del bencimidazol que ha sido sintetizado(19) aunque el espectro de acción no es muy amplio ya que inhibe solamente a algunos miembros del grupo Picorna(20) y al virus LCM(21). El efecto antiviral lo ejerce a través del bloqueo de la síntesis del ARN viral impidiendo la formación de la polimerasa viral.

El bis-bencimidazol⁶ derivado también del bencimidazol reprime con mayor eficacia, 1000 veces más activo, la replicación del virus polio in-vitro comparado con el HBB(22), actuando además sobre todo el grupo Picorna, especialmente los rinovirus(23).

El bis-bencimidazol ha sido ensayado in-vivo en distintos sistemas; en chimpancés previno la infección con rinovirus(24) y en ratones adultos infectados con LCM prolongó la vida de los mismos(25).

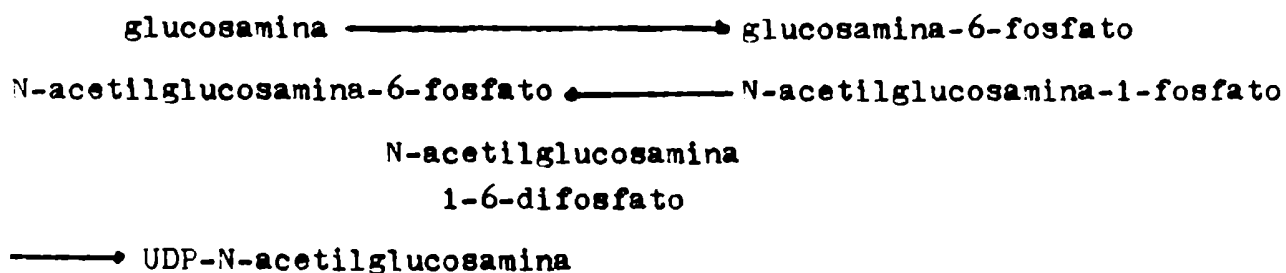
DROGAS NO EstrictAMENTE ANTIVIRALES

Además de los compuestos mencionados hasta aquí existen otros compuestos de efecto virucida in-vitro aunque no se conocen datos de experimentación en animales. Dichos compuestos no pueden ser considerados como drogas sino como antimetabolitos. Sin embargo poseen un incalculable valor, ya que permiten conocer el mecanismo de replicación viral y eventualmente formar parte de moléculas más complejas que permitan su uso como antiviral. Entre estos compuestos los más importantes para este estudio son la 2-deoxi-D-glucosa⁷ y la glucosamina⁸.

Si bien los primeros experimentos realizados con la 2-deoxi-D-glucosa fueron presentados en 1959(26) hasta hace cinco años no se demostró la importante actividad antiviral de los análogos de la glucosa.

Los primeros hallazgos fueron realizados por Kaluza y col.(27) que trabajando con el virus Influenza demostraron la inhibición de la síntesis de las glicoproteínas virales en presencia de glucosamina o 2-deoxi-D-glucosa.

La glucosamina agota el pool de UTP de la célula huésped(28)(29) de acuerdo al siguiente esquema:



el UDP-N-acetilglucosamina se acumula en las células.

La glucosa compite con la entrada y metabolismo del aminoazúcar de-

bido a que la glucosamina es transportada y fosforilada por el mismo sistema. Por esta razón, si el medio contiene glucosa, como fuente de energía se requerirá mayor concentración de glucosamina para obtener un efecto específico.

Se ha demostrado que la glucosamina y la 2-deoxi-D-glucosa interfieren en la replicación de virus ARN con envoltura pertenecientes a la mayoría de los grupos taxonómicos conocidos (27)(30-35). Mientras que otros virus como VSV o NDV (Estomatitis Vesicular o Enfermedad de Newcastle) (27) que también contienen glicoproteínas en su envoltura son poco sensibles, en las mismas condiciones.

La acción inhibidora de ambas drogas sobre la multiplicación de los virus con envoltura mencionados anteriormente es completamente reversible si se retira la droga en cualquier momento del ciclo viral. Este hecho implica además que los compuestos no ejercen un efecto letal sobre la célula huésped.

Los numerosos trabajos realizados han permitido establecer que la glucosamina actúa sobre la replicación viral a través de dos mecanismos diferentes, dependiendo ellos de la composición del medio.

Si el medio contiene glucosa la glucosamina interfiere con la correcta glicosilación de las proteínas de la envoltura viral (27)(35)(36) lo que probablemente se deba a la acumulación de UDP-N-acetilglucosamina.

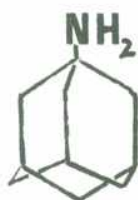
Si el medio contiene fructosa o piruvato como fuente de energía la glucosamina agota el pool de UTP celular impidiendo así la síntesis viral.

El mecanismo de la 2-deoxi-D-glucosa difiere algo de la anterior aunque también su efecto lo ejerce a través de las glicoproteínas de la

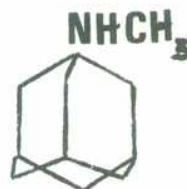
envoltura. Se ha demostrado que la 2-deoxi-D-glucosa reemplaza a los grupos manosa impidiendo la elongación y ramificación de las cadenas peptídicas.

La glicosilación incorrecta afecta en distinto grado a los diferentes virus. Así en el caso de Influenza, Toga o virus de Sarcoma no hay prácticamente formación de partículas físicas o infecciosas. Algo similar ocurre con el virus Herpes, aunque en presencia del inhibidor se incorporan los polipéptidos mal glicosilados y las partículas resultantes carecen de infectividad. El virus VSV por el contrario no sólo incorpora las glicoproteínas defectuosas sino que además esas partículas mantienen su infectividad.

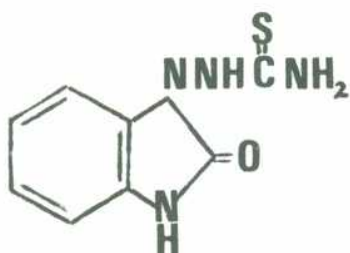
FORMULAS



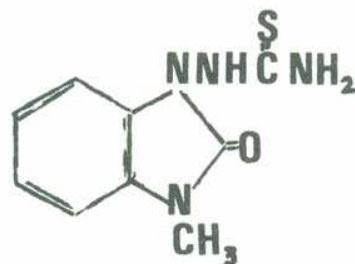
1) Amantadina



2) Rimantadina



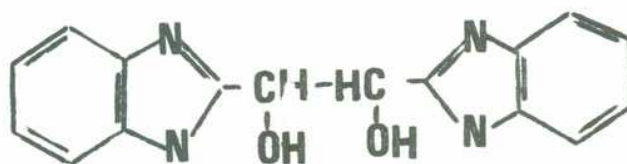
3) Isatin beta-tiosemicarbazona



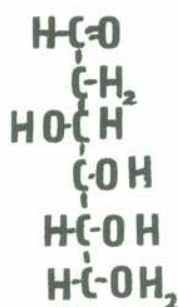
4) N-metilisatin beta-tiosemicarbazona



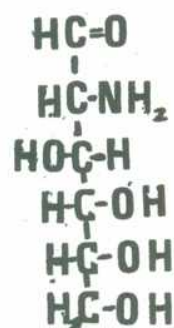
5) HBB



6) Bis-bencimidazol



7) 2-deoxi-D-glucosa



8) Glucosamina

a, no modificaron la sintomatología característica de la FHA en el cobayo (37).

Algunos años más tarde la amantadina se ensayó con éxito frente a

DROGAS ANTIVIRALES ENSAYADAS EN ARENAVIRUS

En 1969, Coto y col.(7)(8) encontraron que la amantadina impedía la replicación del virus Junín en células Vero. Los mismos autores observaron que la amantadina no protegía a los cobayos infectados con la cepa patógena XJ y tratados oralmente con distintas dosis de droga(7). La acción sobre los cobayos fue drástica ya que la amantadina potenció el curso de la enfermedad. Los cobayos tratados con 20mg diarios murieron antes que el grupo control mientras que dosis menores, 10 mg por día, no modificaron la sintomatología característica de la FHA en el cobayo(37).

Algunos años más tarde la amantadina se ensayó con éxito frente a los virus LCM, Tacaribe, Paraná y Pichindé(6)(9) in-vitro. Los sistemas celulares empleados fueron las BHK(cepa celular de riñón de hámster bebé) y las L (línea continua de fibroblastos de ratón). El mecanismo propuesto, por estos autores, fue que la amantadina actuaba a nivel de penetración y no durante la adsorción, encontrando también una acción inhibidora sobre la liberación de los viriones.

La amantadina se ensayó en enfermos de FHA(38), en los cuales produjo alguna mejoría, disminución del estado febril, pero su uso no prosperó debido a sus efectos anfetamínicos colaterales.

El bis-bencimidazol afecta la replicación de algunos miembros del grupo Arenavirus: LCM, Paraná y Pichindé en células cultivadas in-vitro(39). Los estudios se hicieron extensivos a ratones adultos infectados con virus LCM. El tratamiento con 0,5 mg de droga por día retrasó el día promedio

de muerte (25), aunque los animales murieron con una sintomatología característica. Se postuló que el compuesto no actuaría en forma directa como antiviral sino indirectamente mediante su acción como inmunosupresor(25).

Los derivados de la tiosemicarbazona :el isatin beta-tiosemicarbazona y el N-metil isatin beta-tiosemicarbazona también bloquean la replicación de los virus LCM, Paraná y Pichindé en células HeLa(línea continua de carcinoma humano) o en células L(17)(18). Simultáneamente se encontró que ciertos cationes bivalentes aumentaban considerablemente la actividad antiviral de la N-metil isatin beta-tiosemicarbazona(17). El catión más efectivo fue el ión cúprico(Cu^{+2}) cuya acción antiviral se debió a una inhibición por contacto directo de la infectividad.

La administración combinada del N-metil isatin beta-tiosemicarbazona con iones cúpricos no produjo una respuesta bien definida ya que en algunos experimentos los ratones adultos infectados con virus LCM y tratados oralmente con la mezcla, se recuperaron de la infección mientras que en otros casos los ratones murieron con la sintomatología típica(40).

PIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA

La Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) es una enfermedad endemo-epidémica que causa un alto grado de mortalidad entre los pobladores de una vasta zona agrícola ganadera de nuestro país.

Los primeros enfermos de FHA se denunciaron a partir de 1943, sin embargo recién en 1955 se la reconoce como una nueva enfermedad de probable etiología viral. Es en ese año, cuando además se describieron las manifestaciones clínicas, los síntomas y su evolución.

El agente etiológico de la FHA, el virus Junín, fue aislado simultáneamente en 1958 por dos grupos de trabajo independientes (41) (42) a partir de sangre de enfermos de un hospital de la zona afectada.

La FHA se caracteriza por producir en el hombre una enfermedad de variada intensidad causando disturbios renales, hematológicos y cardiovasculares. El período de incubación oscila entre 8 y 12 días. Luego de una etapa aguda febril de 8 a 10 días de duración sucede una convalecencia prolongada con pérdida del cabello, pero por lo común sin secuelas permanentes. Los casos graves presentan manifestaciones neurológicas y/o hemorrágicas tales como convulsiones, hemorragia profusas, coma, shock o una combinación de dichos signos que resulta en la muerte del paciente dentro de las 48 a 72 hs. El porcentaje de mortalidad varía entre un 10 a un 20 % (43).

En un comienzo la FHA estuvo localizada en un área geográfica reducida (16.000 Km²) de la provincia de Buenos Aires y afectaba casi exclusivamente a los trabajadores rurales en especial a aquellos de-

dicados a la cosecha de cereales tales como girasol, trigo y maíz. Por esa razón, la enfermedad se conoce también con el nombre de Mal de los Rastrojos. A través de los años esa zona se ha ido extendiendo hacia el norte y el oeste en cientos de kilómetros (100.000 Km^2) afectando a una población de 1.200.000 habitantes. Esta área endémico-epidémica abarca las provincias de Buenos Aires, Córdoba y sur de Santa Fé.

El virus Junín persiste en la naturaleza asociado a los roedores silvestres que viven en la zona endémica. Las especies más numerosas que habitan esos campos son *Calomys musculinus* y *Akodon azarae*. Diversos trabajos han demostrado que animales pertenecientes a esas especies se encuentran persistentemente infectados con el virus Junín (44). Estudios más recientes, de microscopía electrónica, han demostrado que el virus multiplica en glándulas salivales (45). Los animales eliminan virus por orina y por saliva.

El tratamiento más empleado de la enfermedad es la administración de suero de convalescente. Durante algunos años se ensayó una vacuna a virus vivo (46) pero actualmente no está en uso. Sin embargo independientemente de la obtención de una vacuna efectiva, es necesario encontrar una droga que permita contrarrestar los efectos de la multiplicación viral en el organismo. El tratamiento con drogas antivirales sería más ventajoso considerando que la FHA se caracteriza por presentar una prolongada viremia y que además se cuenta con un buen diagnóstico precoz. Esta terapia ayudaría a disminuir la duración y la intensidad de la FHA.

OBJETIVOS

El objetivo de esta investigación fue encontrar una droga que inhibiera en forma efectiva la multiplicación del virus Junín y determinar su mecanismo de acción para luego utilizarla como quimioterápico en el tratamiento de enfermos de FHA. Con tal fin se estudió comparativamente el efecto de la amantadina, rimantadina, 2-deoxi-D-glucosa, glucosamina y un derivado soluble del bis-bencimidazol (BI) sobre la replicación del virus en cultivos de células Vero. También se realizaron experimentos in-vivo utilizando ratones jóvenes.

La elección de estos compuestos no fue arbitraria sino que para su elección se tuvieron en cuenta aquellas drogas que actuaban sobre virus de composición o estructura análoga aunque no estuvieran relacionados serológicamente, o bien se ensayaron drogas actuantes sobre otros Arenavirus.

Como se indicó anteriormente la amantadina ya había sido ensayada con el virus Junín (7)(8), sin embargo se la incluyó para usarla como referencia en el estudio de su derivado la rimantadina.

Los derivados de la glucosa, la 2-deoxi-D-glucosa y la glucosamina actúan inhibiendo la multiplicación de virus ARN con envoltura pertenecientes a todos los grupos taxonómicos conocidos con excepción de los Arenavirus que no habían sido estudiados. Como las propiedades del virus Junín concuerdan con esas características: poseer un genoma constituido por ARN (47) y una envoltura lipoproteica, se probó la acción de ambos compuestos sobre la replicación viral.

El BI se eligió por su actividad antiviral sobre el virus LCM y otros integrantes de la familia Arenaviridae a la que pertenece el virus Junín(49).

En consideración a los resultados obtenidos en los primeros ensayos se seleccionó la droga de mejor índice quimioterápico (IQ) para dilucidar su mecanismo de acción in-vitro. Como no existían datos bibliográficos para otros Arenavirus las investigaciones se extendieron a los virus Pichindé y Tacaribe.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

CULTIVOS CELULARES

Células Vero: El cultivo celular empleado en la mayor parte de los experimentos fue la línea continua de riñón de monoverde africano, *Cercopithecus aethiops*, denominada Vero. Las células fueron crecidas en medio de Hank's (solución salina tamponada), suplementado con 10% de solución de hidrolizado de lactalbúmina al 5%, con 6% de suero de ternero inactivado y 50 ug/ml de gentamicina (HLS). La línea se mantuvo mediante uno o dos repiques semanales en dicho medio y se las utilizó entre los pasajes 250 a 320. El medio de mantenimiento utilizado fue, en algunos casos, el mismo de crecimiento (HLS), mientras que en otros experimentos se usó el medio de Eagle conteniendo 3% de suero de ternero inactivado y antibióticos.

Células RK13: La línea continua RK13 de riñón de conejo fue crecida en medio 199 suplementado con 10% de suero de ternero inactivado y la misma concentración de gentamicina que el medio HLS. Estas células se mantuvieron en el laboratorio por repiques semanales de la misma forma que las células Vero.

VIRUS

JUNIN: Se utilizó la cepa atenuada denominada XJC13(50), la prototipo XJ(41) y la cepa Mones Cazón(51), mantenidas todas ellas por pasajes sucesivos en cerebro de ratón lactante. Los títulos de los stocks de las distintas cepas fueron de 9×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 UFP/ml respectivamente.

TACARIBE: Se trabajó con cepa TRIV 11573 crecida en cerebro de ratón lactante. El título del stock fue de 6×10^7 UFP/ml.

PICHINDE: Se empleó la cepa An-3839 mantenida por pasajes sucesivos en cerebro de ratón lactante. El título del stock fue de 2×10^7 UFP/ml.

PREPARACION DE STOCKS DE LOS VIRUS JUNIN, TACARIBE Y PICHINDE

Los stocks de los distintos virus se prepararon en cerebro de ratón lactante para lo cual ratones albinos suizos se inocularon intracerebralmente con 1×10^3 DL50 para ratón de virus Junín (XJ, XJC13 o Mones Cazón), o de virus Tacaribe o de virus Pichindé. Los animales se sacrificaron al séptimo día después de la inoculación, cosechándose los cerebros. Luego se preparó un homogeneizado al 10% de cerebro de ratón en solución de buffer fosfato suplementado con 10% de suero de ternero inactivado y antibióticos. El homogeneizado se centrifugó a 12.500 g durante 1 hora utilizándose el sobrenadante como fuente de virus (47). Los stocks se fraccionaron y se conservaron a -70°C . La infectividad de cada uno de ellos se determinó por la técnica de formación de placas bajo agar.

COMPUESTOS QUIMICOS

Los compuestos químicos utilizados fueron:

- Sal soluble del (S,S)-1,2-bis(5-metoxi-2-bencimidazolil-1,2-etandiol) que se denominó BI, fue obtenido de Abbott Laboratories, código comercial A3753

- 2-deoxi-D-glucosa, fue adquirida en Sigma Chemical Company
- glucosamina-ClH, fue adquirida con fines comparativos en distintos laboratorios: K&K Laboratories, Plainview, NY ;Sigma Chemical Company y Pfanstich Laboratories, Alemania.
- amantadina-ClH, Virasol, fue obtenida de los Laboratorios Phoenix.
- rimantadina-ClH, fue adquirida en E.I. Du Pont de Nemours & Co(INC).

La solución de BI se preparó estérilmente en medio de Eagle suplementado con 3% de suero de ternero inactivado y antibióticos, diez veces más concentrada antes de ser usada. Las soluciones de 2-deoxi-D-glucosa y glucosamina se prepararon 0,1 M en agua destilada y se esterilizaron por filtración a través de membranas Millipore. Estas soluciones se guardaron a 4°C hasta su uso. Los medios conteniendo las distintas concentraciones de ambos compuestos se realizaron de tal modo que su composición final resultó igual a la del medio control. Las soluciones de amantadina y rimantadina se hicieron en medio de Eagle suplementado con suero y antibióticos antes de usarse.

DROGAS RADIATIVAS

Para la marcación del ácido ribonucleico celular (ARN) se empleó ^3H -uridina cuya actividad específica fue de 35 uCi/mM. La ^{35}S -metionina se utilizó para la marcación de las proteínas celulares, siendo su actividad específica de 489Ci/mM. Ambos radioisótopos fueron obtenidos de New England Corporation.

DETERMINACION DE LA INFECTIVIDAD

Todas las muestras de virus provenientes de sobrenadantes o extractos celulares se titularon en células Vero por registro de la acción citopatógena (ACP) o mediante el método de unidades formadoras de placas bajo agar (UFP).

TITULACION POR OBSERVACION DEL EFECTO CITOPATICO: Los cultivos de células Vero crecidos en tubos de ensayo se infectaron con diluciones apropiadas de cada muestra viral. El inóculo se dejó adsorber durante 1 hora a 37°C. Al finalizar la adsorción se descartó el inóculo y los cultivos recibieron 1 ml de medio de mantenimiento. Siempre se utilizaron cuatro cultivos por dilución. Durante 10 días se observó el efecto citopático producido por el virus en los cultivos. Los resultados se registraron diariamente cuantificándose la ACP de 1 a 4 de acuerdo a escalas pre-establecidas, correspondiendo el valor de 1 al 25% del tejido con alteraciones características, 2 al 50%, 3 al 75% y 4 al 100%. A partir del 50% se consideró ACP positiva. Se calculó la dosis infectante cincuenta (DICT50) para cultivo de acuerdo al método de Reed y Muench (52).

TITULACION POR EL METODO DE UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS: Las monocapas confluentes de células Vero de 72 horas se infectaron en forma similar a la descrita en el método anterior. El inóculo se dejó adsorber durante 1 hora a 37°C con agitación suave cada 15 minutos. Luego de la adsorción se retiró el virus no adsorbido y las células se lavaron con buffer salino fosfato (PBS). Inmediatamente las células se cubrieron con una capa de agar nutritivo y se incubaron a 37°C durante una

semana. Transcurrido ese tiempo los cultivos se fijaron con una solución de formaldehído al 10% durante 20 minutos, retirándose luego la capa de agar. Seguidamente las células se tiñeron con una solución de cristal violeta al 1% durante 20 minutos. Se contó el número de placas obtenidas para cada dilución y el título se calculó teniendo en cuenta el volumen del inóculo y la dilución. Los resultados se expresaron como UFP/ml.

REACCION DE NEUTRALIZACION

PREPARACION DE INMUNOSUEROS ANTI-VIRUS JUNIN: Se prepararon inmunoseros específicos anti-virus Junín inoculando conejos con los sobrenadantes purificados de las células Vero infectadas con la cepa XJCl3. Los cultivos infectados a una multiplicidad de 0,5 UFP por célula se incubaron con medio HLS conteniendo 10^{-4} M de glucosamina o en medio HLS sólo. A las 24, 48 y 72 hs pi se cosecharon los sobrenadantes, los que se purificaron de acuerdo a procedimientos ya descriptos (53)(54). El proceso de purificación comprendió los siguientes pasos: a) centrifugación a baja velocidad para separar los restos celulares y las células muertas. b) precipitación con igual volumen de una solución saturada de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ en buffer TES (Tris-ClH 0,01M, EDTA 0,001M y ClNa 0,1M) durante 30 minutos a 0°C c) separación del precipitado por centrifugación a 12.000 rpm durante 20 minutos en una centrifuga Sorvall y posterior lavado del mismo con una solución al 50% de saturación de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ en TES. d) disolución del precipitado en TES y centrifugación en las mismas condiciones. e) ultracentrifugación en gradiente discontinuo de

sacarosa de 15-60% a 25.000 rpm durante 4 horas (rotor SW 27 Ultracentrífuga Beckman modelo L-2). f) cosecha de la interfase en la que se encuentra el virus purificado.

Estos antígenos purificados se inocularon en conejos New Zeland White. El esquema de inoculación consistió en administrar semanalmente por vía endovenosa tres dosis de 0,8 ml de cada uno de los antígenos. A los 45 días de finalizada la inmunización se sangraron los animales y los sueros se mantuvieron estériles a -20°C hasta su titulación. Se denominó inmunosuero C al obtenido por inmunización con los sobrenadantes purificados de los cultivos infectados en ausencia de la droga e inmunosuero G al resultante de inocular con los sobrenadantes purificados de los cultivos infectados y tratados con la droga.

ENSAYO DE NEUTRALIZACION: Los anticuerpos neutralizantes de los inmunosueros específicos anti-virus Junín se midieron por la técnica de reducción de placas bajo agar o por inhibición de la ACP. Los inmunosueros, preparados como se describió en el párrafo anterior, se inactivaron a 56°C durante 30 minutos, luego se diluyeron al medio desde 1:5 hasta 1:80 en medio de mantenimiento. Cada dilución se mezcló con 100 UFP de virus Junín, cepa XJC13 y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Simultáneamente se incubaron mezclas controles de virus con inmunosuero normal de conejo. Al finalizar la neutralización se midió la infectividad residual por el método de unidades formadoras de placas o por ACP. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de neutralización, haciéndose el cociente entre el título de la serie tratada con inmunosuero anti-virus Junín y el título de la serie tratada con el inmunosuero normal de cone-

jo. Se consideró neutralización positiva para el método de placas a una reducción en los títulos de 80% o más y para el método de ACP una reducción de dos logaritmos(55)

MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA(IF)

Los antígenos citoplasmáticos sintetizados en los cultivos de células Vero infectados con la cepa XJC13 se determinaron por la técnica indirecta de IF (56). Las células normales e infectadas a distintas multiplicidades, con y sin tratamiento con glucosamina se estudiaron a las 24, 48 y 72 hs pi. Las células fijadas con acetona a 4°C se hicieron reaccionar primero con anticuerpos específicos anti-virus Junín (suero de convalescente o líquido ascítico de ratones hiperinmunes) y luego con gama-glubulina humana o de ratón conjugada con isocianato de fluoresceína a temperatura ambiente (20-25°C). Después de cada reacción los cubres se lavaron dos veces con PBS. Finalmente se montaron con Elvanol y se examinaron en un microscopio Zeiss con equipo de iluminación para fluorescencia EPI.

Para detectar el antígeno de superficie se incubaron los diferentes cultivos con el inmunosuero específico y luego se fijaron con una solución de formaldehído al 10% (57); La reacción se continuó en forma similar a la anterior. El porcentaje de células fluorescentes se determinó contando 500 células por cultivo.

MICROSCOPIA ELECTRONICA(ME)

La presencia de partículas físicas se determinó por ME en células Vero infectadas con la cepa XJC13 a alta multiplicidad de infección. A las 24,48 y 72 hs pi se fijaron los cultivos con una solución de glutaraldehído al 2% en buffer fosfato a 4°C. Luego de 12 horas de lavado en dicho buffer se trataron con tetróxido de osmio al 1% en buffer. Finalmente el material se incluyó en Araldita y se cortaron secciones ultrfinas con un micrótomo LKB, coloreándose las con citrato de plomo y acetato de uranilo. Los cortes se analizaron en un microscopio Philips 200 operado a 60 Kw. Las conclusiones se sacaron luego de observar 500 células, infectadas con y sin tratamiento con glucosamina.

PUREZA DE LOS COMPUESTOS

En todos los casos las drogas se utilizaron tal como habían sido provistas por los laboratorios con la excepción de la glucosamina que fue sometida a un análisis riguroso para descartar la presencia de cationes contaminantes tales como Mn, Fe, Co, Ni y Cu que actúan potenciando el efecto de algunas drogas inhibidoras de la multiplicación del virus LCM(16)(17). El estudio comprendió la determinación del poder rotatorio, el ensayo de glucosaminas de distinto origen comercial y un análisis por absorción atómica.

DETERMINACION DEL PODER ROTATORIO: Con el objeto de estudiar la pureza de la glucosamina se determinó el poder rotatorio de la misma. Para lo cual se preparó una solución en un matraz de peso conocido. Una cantidad de 23,5 mg de glucosamina se disolvió en 3,865 dm³ de

agua destilada. La solución se dejó estabilizar a temperatura ambiente y las lecturas se realizaron a las 24 horas. Las mediciones se efectuaron en un polarímetro automático Parker calculándose el poder rotatorio por la siguiente fórmula:

$$\alpha = \frac{\text{lectura} \times \text{volumen}}{\text{masa} \times \text{long. tubo}}$$

Los valores obtenidos con la solución problema fueron:

0,430; 0,431; 0,433; 0,435 y 0,429

Con el promedio de las lecturas ($\bar{x}=0,432$) se calculó el valor de $\alpha=71,1$. Este valor es bastante próximo al valor teórico $\alpha=72,5 \pm 0,9$, por lo que en primera aproximación se pudo asegurar que el compuesto era glucosamina aunque aún no se podía descartar que estuviera contaminado con trazas de impurezas.

ENSAYO DE GLUCOSAMINAS DE DISTINTO ORIGEN COMERCIAL: Una segunda forma de encarar el problema de los contaminantes de la droga consistió en probar simultáneamente la actividad biológica del compuesto de tres marcas diferentes, las que se detallaron en párrafos anteriores. Con ese fin se midió el rendimiento viral en presencia de $16mM$ de las tres glucosaminas luego de 24 horas de tratamiento. En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos, los que indicaron el efecto bloqueador de la glucosamina y mostraron que el origen diferente no influyó en la efectividad.

ANALISIS DE LA GLUCOSAMINA POR ABSORCION ATOMICA: Si bien los métodos anteriores permitían suponer que el efecto observado se debía a la droga ninguno de ellos aseguraba la ausencia de cationes bivalentes en la solución de glucosamina. Por esa razón se la analizó por absorción

atómica. Estas experiencias se realizaron en la Comisión de Energía Atómica. Fue necesario preparar una solución testigo que contuviera los cationes buscados; la concentración de los mismos fue de 2ppm (partes por millón) de Fe^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} y Zn^{+2} en agua destilada. Se midió comparativamente la absorbancia de la solución testigo y la muestra problema, que consistió en una solución 0,5M de glucosamina. Las lecturas se hicieron en un equipo marca Jarrell-Ash modelo MBAA 82-529 (Tabla 2).

Con estos resultados se concluyó que la droga utilizada era glucosamina y que no estaba contaminada con cationes bivalentes.

TABLA 1 : Producción de virus infeccioso en presencia de glucosaminas de distinto origen comercial.

Compuesto	Rendimiento viral
	(UFP/ml)
ninguno	$2,5 \times 10^3$
glucosamina A''	< 5
glucosamina B'''	< 5
glucosamina C''''	< 5

' determinado a las 24 hs pi

'' K&K Laboratories

''' Pfanstich Laboratories

'''' Sigma Chemical Co

Tabla 2 : Determinación de cationes por
Absorción Atómica.

Catión	Concentración (ppm)
Fe ⁺²	0,0003
Cu ⁺²	0,001
Ni ⁺²	0,003
Co ⁺²	0,0006
Zn ⁺²	0,008

TOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS

A los efectos de utilizar las drogas dentro de los márgenes no tóxicos para los cultivos se sometieron los mismos a los siguientes procedimientos:

DETERMINACION DE LA MAXIMA CONCENTRACION NO TOXICA PARA LAS CELULAS:

Cultivos de células Vero de 72 horas se incubaron con medio de Eagle conteniendo concentraciones crecientes del compuesto en cuestión durante 24, 48, 72 y 96 horas. Se utilizaron tres cultivos por cada concentración ensayada, las que variaron según el compuesto. Para el BI se probaron 1;5;10; 20;50;75;100 y 200 ug/ml. Para amantadina y rimantadina se ensayó únicamente 40 ug/ml. Los ensayos de toxicidad para glucosamina y 2-deoxi-D-glucosa fueron similares aunque los cultivos se mantuvieron en medio HLS. Las concentraciones probadas fueron para la primera de 0,8;4,0;8,0 y 16 mM y para la segunda de 1;5;10 y 20 mM. Los cultivos se observaron diariamente al microscopio óptico comparando su morfología con cultivos normales no tratados. Se consideró efecto tóxico a la presencia de células redondas sobre la monocapa (necróticas), a las células en el sobrenadante, a las variaciones de pH anormales y/o al desprendimiento de las células de la monocapa.

DETERMINACION DE LA VIABILIDAD CELULAR: La viabilidad celular se determinó por la prueba de exclusión del azul tripán(58). Las monocapas de células Vero tratadas con las distintas concentraciones de inhibidor se dispersaron con tripsina-EDTA al 0,25% en PBS de acuerdo a técnicas ya descriptas(58). Las células se suspendieron en medio HLS mezclándose con azul tripán al 5%. Luego de 30 minutos de incubación a temperatura ambien-

se sembró con pipeta Pasteur una cámara de Neubauer.

El número de células vivas, incoloras, y el número de células muertas azules, se determinaron contando las células de los cuadrados de los vértices. Se realizaron ocho lecturas por cultivo. El promedio de las lecturas multiplicado por el volumen de la cámara (10^4) dió el número de células vivas o muertas por mililitro.

ESQUEMA DE DETECCION DE LA ACTIVIDAD DE LAS DROGAS SOBRE LA MULTIPLICACION VIRAL

Para determinar el efecto de las drogas sobre la replicación viral se recurrió a distintos procedimientos como ser: efecto sobre la replicación, sobre el rendimiento y además sobre las curvas de crecimiento del virus en presencia y ausencia de las drogas.

En conjunto estas técnicas midieron el efecto de las drogas sobre la capacidad del virus para matar a la célula.

EFFECTO SOBRE LA REPLICACION VIRAL: En este caso, la actividad antiviral se evaluó cualitativamente observando la evolución del efecto citopático que el virus produce en la célula huésped. Para medir la acción citopatogénica del virus Junín en presencia de los inhibidores se infectaron los cultivos con la cepa XJC13. Después de 1 hora de adsorción se retiró el inóculo y las células se lavaron una vez con PBS. Inmediatamente se agregó medio HLS con y sin droga. Las concentraciones probadas fueron las resultantes del ensayo de toxicidad. Experimentos realizados con LCM habían demostrado un mayor efecto del BI al pretratar los

cultivos durante 24 horas con el inhibidor (39), por esa razón se repitió el ensayo en esas condiciones. Los medios de mantenimiento se renovaron cada 48 horas. Los cultivos se observaron diariamente al microscopio registrándose las alteraciones producidas. La ACP se cuantificó de 1 a 4 como se describió en la titulación por efecto citopático. A partir del 50% se consideró ACP positiva.

EFEECTO SOBRE EL RENDIMIENTO VIRAL: Por medio de esta técnica se cuantificó la capacidad inhibidora de los compuestos. Para medir el rendimiento viral las células se infectaron en forma similar a la descrita en el párrafo anterior. Los cultivos infectados tratados y sin tratar se incubaron a 37 °C durante 48 horas, al cabo de ese tiempo se cosecharon los sobrenadantes que se mantuvieron a -70 °C hasta su titulación por la técnica de UFP. Simultáneamente se determinó el virus asociado a las células. Para ello, a los tiempos indicados, se lavó la monocapa y las células se sometieron a dos ciclos de congelado y descongelado. El extracto celular así obtenido se centrifugó a baja velocidad para eliminar restos de membranas y células enteras. El sobrenadante se tituló por UFP.

CURVAS DE CRECIMIENTO DEL VIRUS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE LAS DROGA

Las curvas de crecimiento permitieron determinar el efecto de las drogas sobre ciclos múltiples del virus y conocer el grado de inhibición de los compuestos. La curva de crecimiento del virus Junín se estudió en presencia de las concentraciones óptimas de cada inhibidor. El esquema de infección fue el mismo que se aplicó en la determinación del efecto so

la replicación viral. Para determinar el virus liberado espontáneamente se sacaron alícuotas a las 24, 48, 72 y 96 hs pi. La titulación de las mismas se realizó por VEF o ACP según conviniera.

DETERMINACION DEL EFECTO DE LA GLUCOSAMINA SOBRE LA SINTESIS DE LAS MACROMOLECULAS DEL HUESPED

Se determinó el efecto de la presencia de 16 mM de glucosamina sobre la síntesis de ácido ribonucleico y proteínas en células Vero infectadas con virus Junín.

INCORPORACION DE ^3H -URIDINA : Cultivos confluentes de células Vero se infectaron con la cepa XJCl3 como se describió en párrafos anteriores. Los cultivos infectados se incubaron en medio HLS sin droga durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo se reemplazó el medio de los cultivos por medio HLS conteniendo 6% de suero de ternero dializado, 16 mM de glucosamina y 0,5 μCi de ^3H -uridina. A las 4, 8 y 24 horas subsiguientes se detuvo la incorporación y los cultivos se lavaron tres veces con PBS frío. Los cultivos se congelaron con 1 ml de agua destilada para facilitar su ruptura posterior. Al descongelar se agregó otro mililitro de agua y se precipitó con una solución de TCA (ácido tricloroacético) al 50%. El precipitado se filtró sobre discos de papel y se lavó con una solución de TCA al 10%. Los discos secos se colocaron en 10 ml de mezcla PPO-POPOP-tolueno y la radiactividad se midió en un contador Packard. Los cultivos normales con y sin tratamiento con droga se procesaron simultáneamente de la misma manera. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (59). La incorporación se calculó como cuentas (CPM)

por minutos por miligramo de proteína.

INCORPORACION DE ^{35}S -METIONINA Los cultivos infectados se incubaron con medio de Eagle conteniendo 3% de suero de ternero inactivado y dializado y 16mM de glucosamina. La marcación se realizó mediante pulsos de una hora a los tiempos 0,3,7 y 23 hs pi. Cada cultivo recibió 84 uCi de ^{35}S -metionina. La incorporación en la fracción ácido precipitable se determinó una hora después como se describió en el párrafo anterior.

ANIMALES : Se usaron ratones albino suizos criados en el bioterio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Los ratones lactantes se inocularon por diversas vías de acuerdo al esquema de trabajo. Los ratones de 20 días de edad se anestesiaron levemente antes de ser infectados recibiendo un inóculo de virus de 0,02 ml por vía ic. Todos los animales infectados fueron observados diariamente registrándose la evolución de los pesos y los síntomas de enfermedad o muerte.

R E S U L T A D O S

ANALISIS COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRUS JUNIN IN-VITRO DE LOS SIGUIENTES COMPUESTOS: AMANTADINA, RIMANTADINA, 2-DEOXI-D-GLUCOSA GLUCOSAMINA Y BI

Tal como se esquematizó en Materiales y Métodos, la actividad antiviral de cada compuesto se estableció con la realización de distintos experimentos. Las alteraciones observadas en la evolución del efecto citopático (ACP) sirvieron como ensayo orientador del probable efecto inhibitorio, mientras que la valoración de los rendimientos virales y las curvas de crecimiento del virus en presencia y ausencia de los mismos permitió cuantificar la capacidad antiviral de las drogas.

Toxicidad de los compuestos para la célula huésped.

A fin de establecer la cantidad máxima de cada compuesto compatible con la viabilidad celular se procedió como se indicó en Materiales y Métodos.

La concentración del clorhidrato de amantadina probada fue de 40 µg/ml ya que ésta, de acuerdo a datos ya publicados, era la mayor concentración no tóxica para los cultivos de células Vero(7). Por analogía para la rimantadina, un derivado de la amantadina, se eligió la misma concentración de 40 µg/ml. Para las otras drogas, 2-deoxi-D-glucosa, glucosamina y BI, se ensayó un amplio intervalo de concentraciones debido a que se carecían

de datos de toxicidad para el sistema empleado.

Las monocapas tratadas con amantadina no presentaron manifestaciones tóxicas aún después de 96 horas de incubación a 37°C. No ocurrió lo mismo con las de rimantadina que a partir de las 72 horas de iniciado el tratamiento presentaban un mayor número de células muertas en el sobrenadante; este efecto se acentuó a las 96 horas.

La incubación con 200 ug/ml de BI produjo a las 48 horas la muerte de los cultivos lo que se caracterizó por redondeamiento celular y despegue de la monocapa. Las concentraciones restantes, aún la de 100 ug/ml no mostraron un efecto nocivo para las células.

La glucosamina no indujo cambios morfológicos detectables por microscopía óptica con ninguna de las concentraciones probadas, hubo sin embargo una disminución del metabolismo celular que se detectó por el mantenimiento del pH del medio. Casi similar fue el comportamiento de los cultivos tratados con 2-deoxi-D-glucosa, excepto que con la concentración de 20 mM se observó, a partir de las 72 horas, un ligero efecto tóxico demostrado por el redondeamiento de algunas células de la monocapa.

La técnica de exclusión de colorantes vitales permitió cuantificar el porcentaje de células viables.

El recuento celular se efectuó en cultivos tratados con BI y glucosamina, eligiéndose, de acuerdo a los resultados de la observación microscópica, las concentraciones de 75 ug/ml de BI y 16 mM de glucosamina.

Los resultados obtenidos, de acuerdo a la técnica descrita en Materiales y Métodos se resumieron en las Tablas 3 y 4.

Como se observa en la Tabla 3 la incubación con 75 ug/ml de BI no modificó el número de células viables aún después de 120 horas de tratamiento.

Los cultivos normales duplicaron el número de células a las 48 hs. Este efecto no se observó en las monocapas de células Vero tratadas con 16 mM de glucosamina sin embargo se mantuvo la viabilidad celular, estos resultados coincidieron con las observaciones anteriores que indicaron una reducción en el metabolismo celular.

En la Tabla 5 se resumen los valores límites de concentración seleccionada para cada compuesto de acuerdo a los ensayos de toxicidad.

Tabla 3: Determinación del número de células viables en presencia de 75 ug/ml de BI.

CONCENTRACION ug/ml	Día 1 N cél/ml	Día 5 N cél/ml
0	$2,2 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$
75	$2,3 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$

Tabla 4: Determinación del número de células viables en presencia de 16 mM de glucosamina.

CONCENTRACION mM	Día 1 N cél/ml	Día 2 N cél/ml
0	$2,0 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$
16	$1,7 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$

Tabla 5: Concentración máxima de cada droga compatible con la viabilidad celular.

DROGA	CONCENTRACION MAXIMA NO TOXICA
Amantadina	40 ug/ml.
Rimantadina	40 ug/ml
BI	75 ug/ml
2-deoxi-D-glucosa	10 mM
Glucosamina	16 mM

Efecto sobre la replicación viral.

El virus Junín multiplica en distintos sistemas celulares (60) (61) (62) produciendo en algunos de ellos (células Vero) modificaciones morfológicas características que se denominan efecto citopático (62). La alteración que el virus induce en la célula huésped sirve para detectar, identificar y cuantificar a los distintos agentes virales. El tiempo de detección de estos efectos depende del sistema virus-célula huésped, del número de partículas y de las condiciones de infección.

La evolución de la acción citopatógena (ACP) de los cultivos tratados e infectados con los distintos inhibidores se estudió en forma comparativa con cultivos infectados sin tratamiento. Las células Vero infectada con virus Junín presentan un período de latencia de aproximadamente 30 horas en el cual no se observa ningún cambio, sin embargo, entre las 48 y 72 hs. p.i. aparecen células redondas, más oscuras solas o en pequeños grupos (3 ó 4 células) distribuidas sobre la monocapa. A las 72 horas este efecto es más notorio ya que los pequeños grupos forman focos bien visibles de células redondas y oscuras, observándose algunas células muertas en los sobrenadantes. A las 96 horas la ACP se generaliza observándose casi la totalidad del tejido modificado.

Las monocapas de células Vero infectadas con virus Junín y tratadas con 40 ug/ml de rimantadina fueron negativos hasta las 72 hs. p.i. ya que no mostraron ninguna diferencia con los cultivos normales sin infectar. Transcurrido ese tiempo apareció la ACP notándose un ligero efecto inhibidor de la rimantadina puesto de manifiesto por la reducción en un 50% del tejido tomado.

Resultados similares se obtuvieron con amantadina, aunque en éstos la diferencia con los controles fue más notoria ya que los primeros focos se observaron a las 96 hs. p.i.

En el estudio de la evolución de la ACP en presencia de distintas concentraciones de BI los cultivos se pretrataron durante 24 horas para obtener una mayor eficiencia del compuesto, como se había demostrado para LCM (39). El tratamiento con 5; 10 y 20 ug/ml de BI no modificó el tiempo de aparición ni la intensidad de la ACP. Sin embargo concentraciones mayores que 50 ug retrasaron en 2 días la ACP sugiriendo un efecto inhibitorio sobre la replicación viral.

Los tratamientos realizados con las distintas concentraciones de glucosamina mostraron la ausencia total de efecto citopático al tratar con dosis superiores a 4 mM.

Con 1 y 5 mM de 2 deoxi-D-glucosa se observó la misma evolución de la ACP que en los cultivos controles. Para concentraciones mayores que 10 mM se apreció un retraso de 2 días mientras que con 20 mM fue difícil detectar esta diferencia debido a la toxicidad exhibida por la droga como se vió en los ensayos de viabilidad. Estas observaciones indicaron un grado de efectividad diferente para cada compuesto.

En la Tabla 6 se resumieron los resultados de este ensayo.

Tabla 6: Determinación del grado de efectividad de los compuestos.

COMPUESTO	CONCENTRACION	GRADO DE EFECTIVIDAD*
Amantadina	40 ug/ml	regular
rimantadina	40 ug/ml	bueno
BI	50 a 100 ug/ml	bueno
2-deoxi-D-glucosa	10 mM	bueno
glucosamina	4 a 16 mM	muy bueno

* Determinado en función de la evolución de la ACP de los cultivos infectados y tratados con los diferentes compuestos en comparación con cultivos infectados sin tratar.

Efecto sobre el rendimiento viral.

Los ensayos preliminares señalaron la mayor efectividad de algunos de los compuestos, sin embargo no es posible cuantificar su acción en esta forma. Por tal motivo se decidió establecer con mayor exactitud el efecto de cada uno de ellos sobre la multiplicación del virus Junín. La determinación de los rendimientos virales permitió, además la elección de la concentración óptima de cada droga en base a su efecto antiviral.

El rendimiento de virus Junín producido después de 48 horas de incubación con las concentraciones comprendidas dentro de los valores no tóxicos se realizó como se describió en Materiales y Métodos. Cada punto representa el cociente entre el título obtenido en presencia de una determinada concentración de inhibidor y el título obtenido sin tratamiento.

Como puede observarse la 2-deoxi-D-glucosa, el BI y la glucosamina presentaron un efecto inhibidor que fue dependiente de la concentración o sea que cuanto mayor fue la dosis empleada menor resultó la producción de virus. El grado de inhibición mostrado por cada uno de ellos fue diferente, así las mayores concentraciones de BI (75 y 100 ug/ml) redujeron en un logaritmo la replicación viral, mientras que concentraciones menores o iguales que 40 ug/ml carecieron de efecto.

Con 1 y 5 mM de 2-deoxi-D-glucosa no hubo en los títulos una reducción significativa, sin embargo con 10 mM ésta fue de un logaritmo y con 20 mM se acentuó la inhibición alcanzando un valor de 99% (2 logaritmos).

A partir de 4 mM de glucosamina, todas las concentraciones ensayadas produjeron una marcada disminución del rendimiento viral. El tratamiento con 16 mM de glucosamina no permitió detectar partículas infecciosas en

los sobrenadantes de los cultivos infectados indicando que no habría formación de viriones. Esta dosis (16 mM) redujo el título en un 99,99% (4 logaritmos).

El rendimiento viral en presencia de 40 ug/ml de amantadina o rimantadina fue prácticamente idéntico al valor del control.

De acuerdo a estos resultados se seleccionó la concentración de cada compuesto de máximo efecto inhibitorio y mínima toxicidad para el sistema: células Vero-virus Junín.

Las concentraciones de 75 y 100 ug/ml de BI produjeron el mismo nivel de inhibición por lo que se prefirió trabajar con la menor de ellas. La concentración de 2-deoxi-D-glucosa elegida fue de 10 mM ya que si bien la concentración de 20 mM produjo una reducción mayor en el rendimiento viral, en algunas experiencias se observó un ligero efecto tóxico. La ausencia de toxicidad de todas las concentraciones de glucosamina ensayadas permitió elegir la de 16 mM.

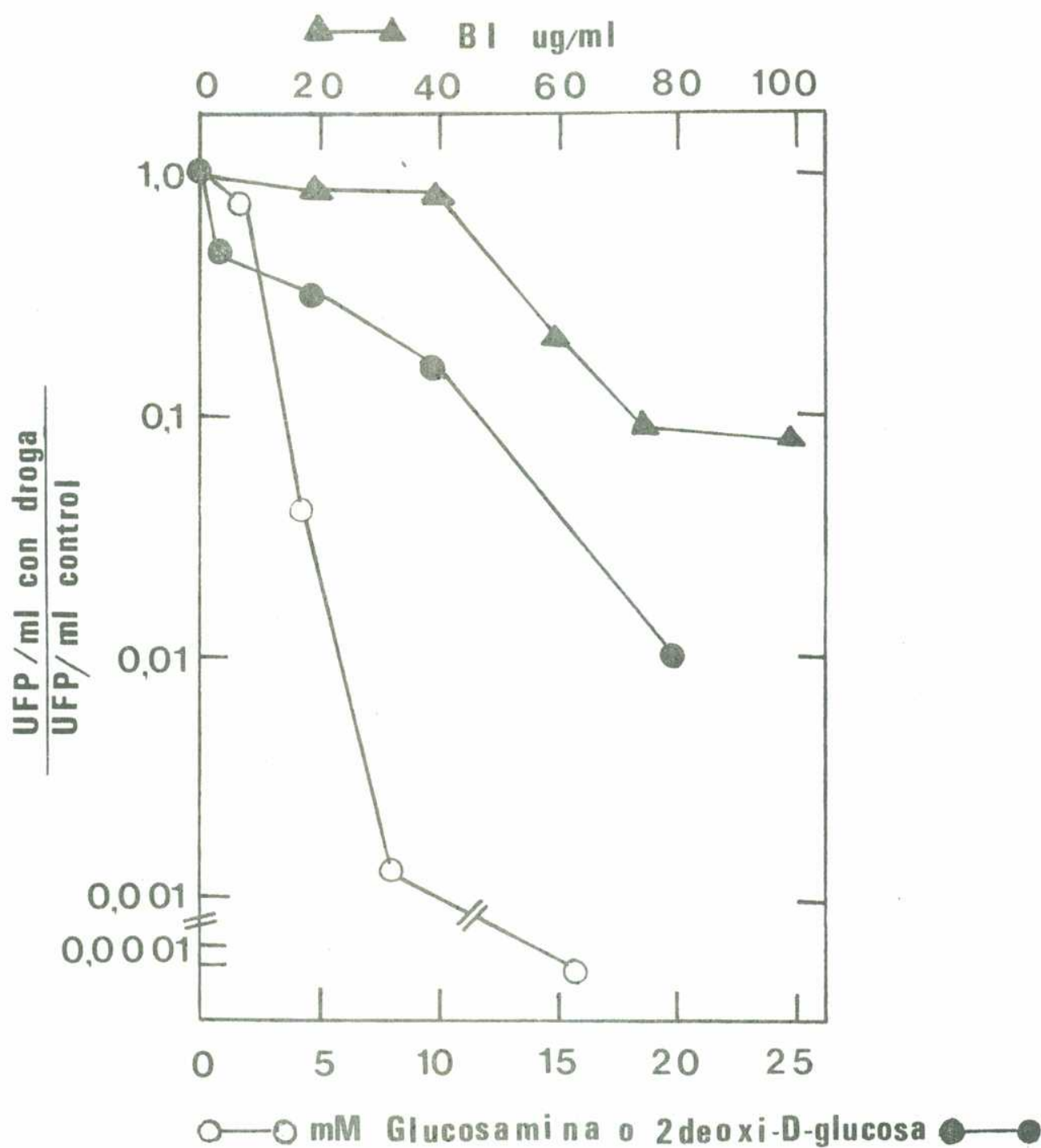


Figura I : Rendimiento de virus Junín en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos.

Curva de crecimiento de virus Junín en presencia de los distintos compuestos.

Luego de seleccionar las concentraciones óptimas de cada inhibidor se decidió investigar el efecto de las mismas sobre varios ciclos múltiples de replicación viral.

Las curvas de multiplicación del virus Junín en presencia de 40 μ g/ml de amantadina o rimantadina, de 75 μ g/ml de BI, de 10 mM de 2-deoxi-D-glucosa y 16 mM de glucosamina se realizaron como se detalló en materiales y métodos.

En la Figura II se representaron los resultados obtenidos en presencia de 40 μ g/ml de amantadina o rimantadina.

Las curvas obtenidas en presencia de amantadina o rimantadina (curvas inferiores) no difirieron significativamente de la del control. Estos resultados concordaron con la observación de la evolución del efecto citopático de los cultivos infectados y tratados con ambas drogas.

En la Figura III se presentaron comparativamente las curvas de crecimiento del virus Junín en presencia y ausencia de BI.

El virus Junín replicó, aunque en menor grado, en presencia de 75 μ g/ml de BI. La inhibición observada a las 24 horas fue de 1 logaritmo, la que se hizo más evidente a las 96 horas alcanzando un valor de 99,9% (3 logaritmos).

La Figura IV muestra las curvas de crecimiento en presencia de 16 mM de glucosamina y 10 mM de 2-deoxi-D-glucosa.

De la forma de las curvas se dedujo que en presencia de glucosamina no hubo replicación viral. Los niveles de inhibición alcanzados variaron desde un 99,9% a las 24 horas hasta un 99,999% a las 96 hs pi. En presencia de 2-deoxi-D-glucosa, la curva de crecimiento del virus Junín fue en las primeras horas similar a la del control, sin embargo a las 48 hs pi se observó un 92,5% de inhibición alcanzando a las 96 hs pi un valor de 99,0%.

De acuerdo a estos resultados se puede concluir que el rendimiento extracelular del virus Junín resultó afectado significativamente en presencia de BI, 2-deoxi-D-glucosa y glucosamina, no ocurriendo lo mismo con la amantadina o rimantadina.

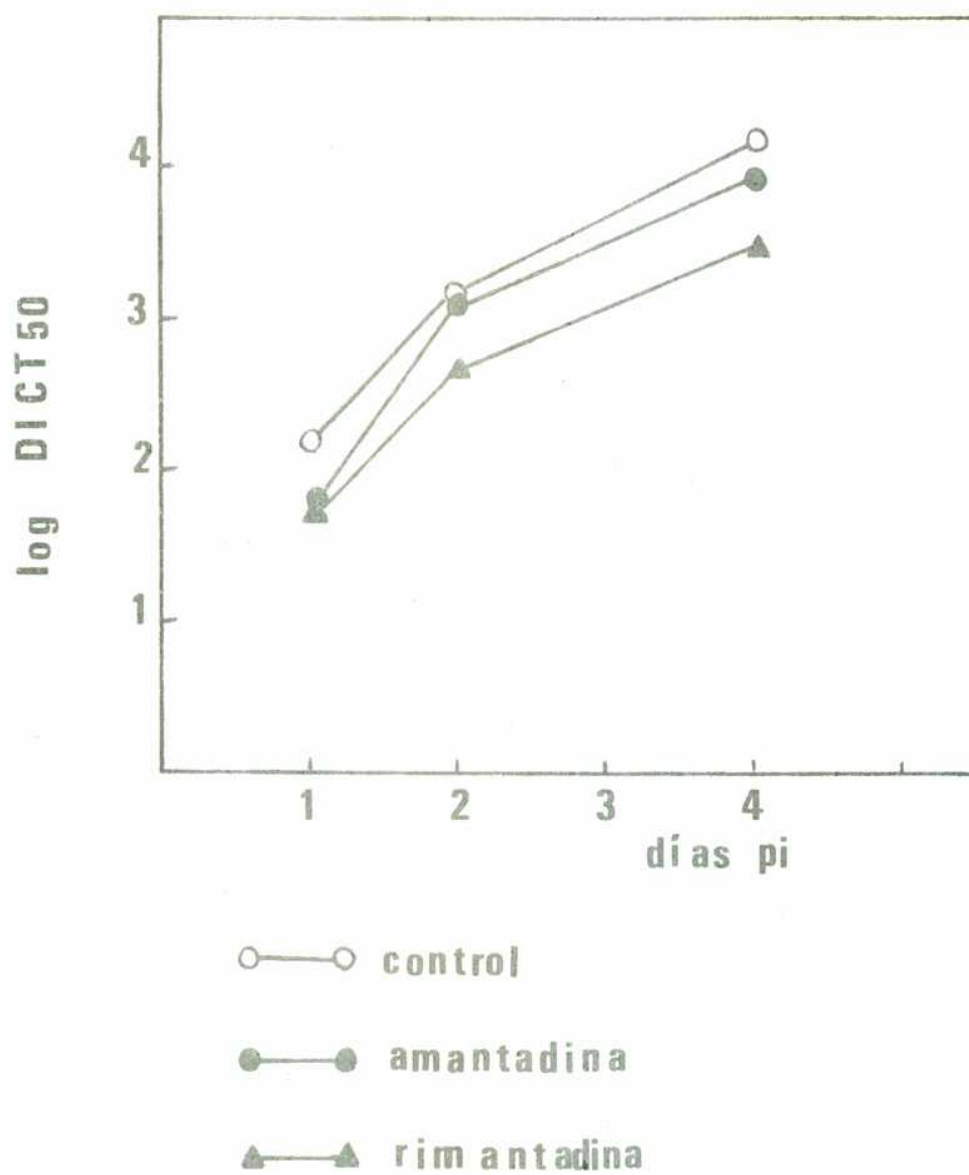


Figura II : Curvas de crecimiento del virus Junín
en presencia de amantadina y rimantadina .

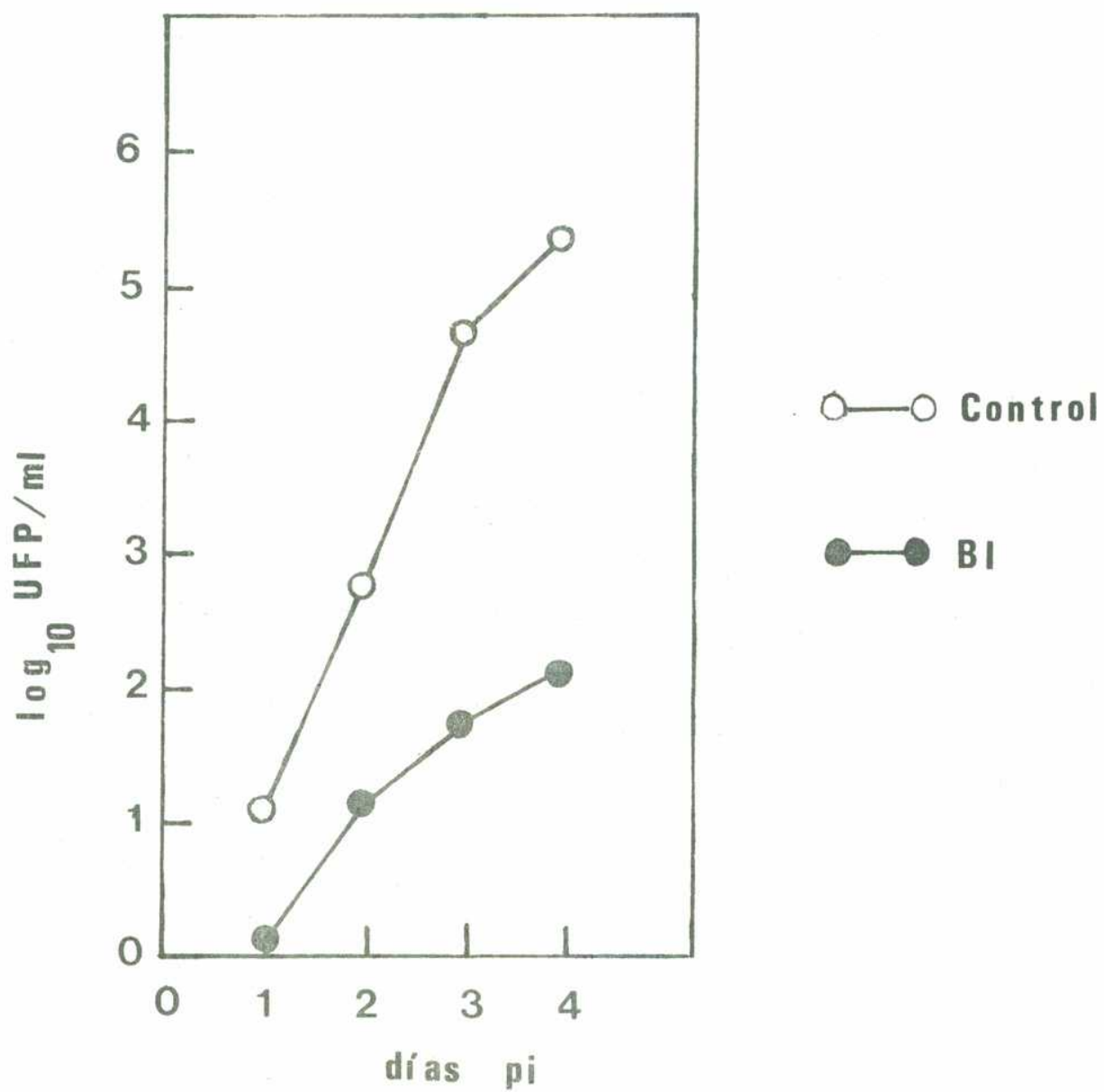


Figura III : Curva de crecimiento del virus Junín
en presencia de BI.

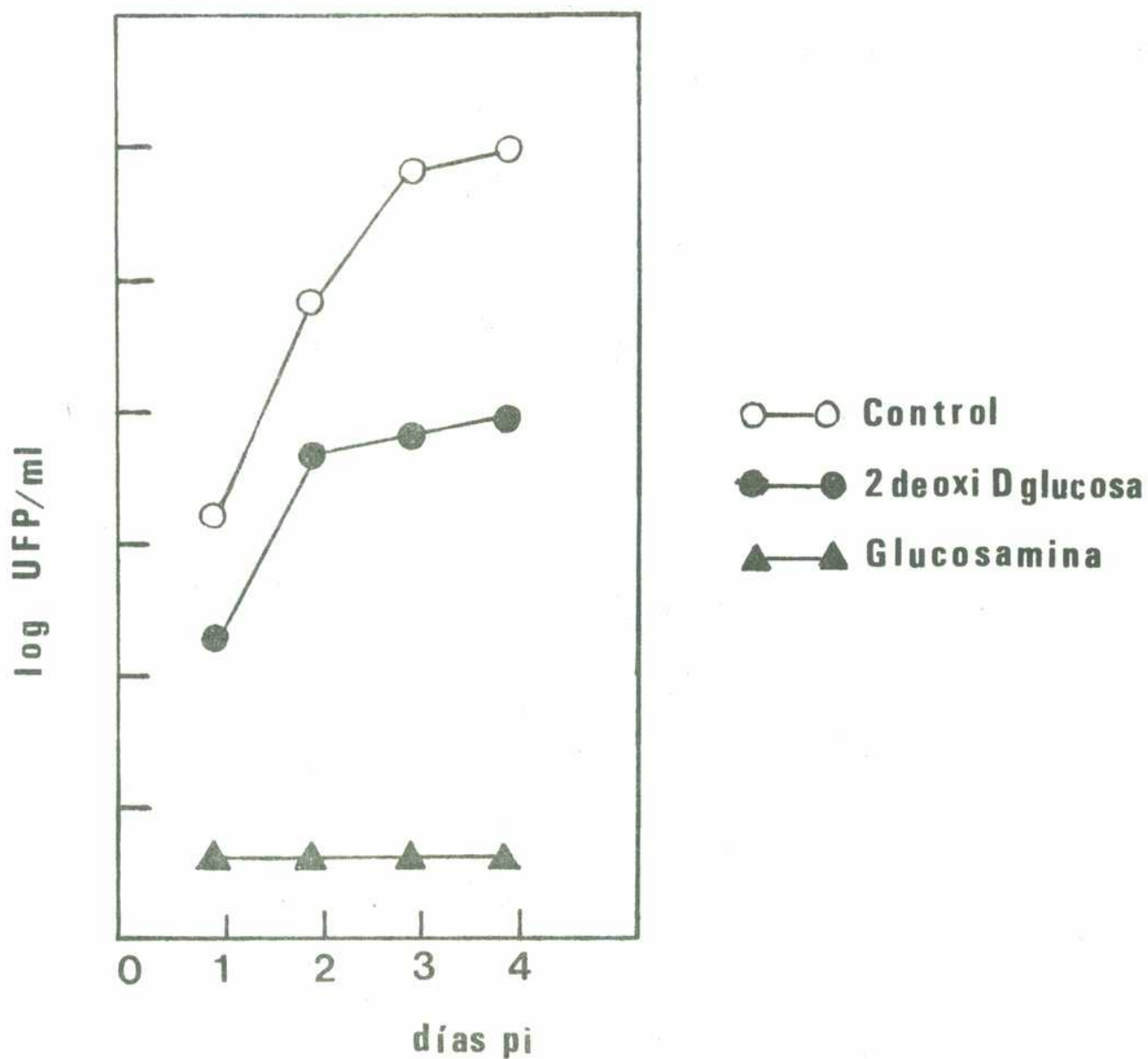


Figura IV : Curva de crecimiento del virus Junín en presencia de glucosamina y 2-deoxi-D-glucosa.

Acción del BI, 2-deoxi-D-glucosa y glucosamina sobre la síntesis de virus asociado a las células

A fin de establecer si el bloqueo de la replicación viral observada en presencia de los inhibidores ocurría en la etapa de brotación, se determinó la síntesis de virus asociado a las células en presencia o ausencia de los compuestos como se describió en Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos se detallaron en la Tabla 7

Tabla 7: Rendimiento de virus asociado a las células en presencia de BI, 2-deoxi-D-glucosa y glucosamina

COMPUESTO	CONCENTRACION	TITULO	% DE INHIBICION A LAS 48 HS PI
BI	0	2×10^5	0
	75 ug/ml	2×10^5	90
2-deoxi-D-glucosa	0	$3,4 \times 10^6$	0
	10 mM	$2,0 \times 10^6$	15
glucosamina	0	5×10^4 (1)	0
	16 mM	<5	99,99

(1) el rendimiento se determinó a las 24 hs pi.

La reducción del rendimiento de virus asociado a las células observado en presencia de BI o glucosamina fue similar a la que ocurrió con el virus liberado espontáneamente.

Los porcentajes de inhibición alcanzaron un valor de 90%, un logaritmo, para el BI y de 99,99, cuatro logaritmos, para la glucosamina.

El nivel alcanzado por las células tratadas con 2-deoxi-D-glucosa fue idéntico al control. Este hecho sugirió que el bloqueo producido por el compuesto ocurriría a nivel de liberación de las partículas al extracelular.

Indices Quimioterápicos de los distintos compuestos

Si se consideran los resultados obtenidos con los diferentes compuestos (Figura I) es posible calcular los IQ correspondientes (Tabla 8).

Tabla 8: Indices Quimioterápicos de las distintas drogas.

COMPUESTO	I Q
Glucosamina	0,25
2-deoxi-D-glucosa	0,50
BI	0,75
Amantadina	1,00
Rimantadina	1,00

Los IQ indicaron a la glucosamina como el mejor quimioterápico in-vitro.

P A R T E I I

MECANISMO DE ACCION DE LA GLUCOSAMINA

Efecto unitario o específico de la glucosamina.

Podría ser que la inhibición observada en presencia de glucosamina no fuera debida al compuesto sino a un contaminante presente en la misma. Se ha demostrado que la adición de cationes bivalentes, especialmente de la primera serie de transición (Mn, Fe, Co, Ni y Cu), aumentan la efectividad del N-metil isatin-beta tiosemicarbazona(16)(17) que inhibe la multiplicación del virus LCM o Sarcoma de Rous.

La verificación de la naturaleza del compuesto y su pureza se determinó mediante ensayos de polarografía y absorción atómica. Así mismo se estudió el efecto de tres compuestos de distinto origen comercial sobre el rendimiento del virus Junín en células Vero para confirmar el efecto específico de la glucosamina. Todas estas pruebas y sus resultados se detallaron en Materiales y Métodos.

La precisión de las mediciones realizadas por absorción atómica permitió asegurar la ausencia de cationes bivalentes. La determinación del poder rotatorio indicó que la droga era glucosamina y la comparación entre los tres compuestos demostró que su origen no influyó en su efecto.

En consecuencia la falta de partículas infecciosas detectables por la técnica de unidades formadoras de placas se debió exclusivamente al efecto del compuesto.

Acción de la glucosamina sobre la infectividad de distintas cepas de virus Junín.

Podría ocurrir que la actividad de la glucosamina sobre la cepa XJC13 fuera debida a una pecurialidad de la misma. Por esa razón se ensayó, en forma comparativa, el tratamiento con glucosamina en cultivos infectados con diferentes cepas de virus Junín. Las cepas usadas fueron la patógena, XJ(41), la atenuada, XJC13(50) y la Mones Cazón(51).

Los cultivos se infectaron como se describió en Materiales y Métodos, midiéndose la liberación de virus alas 24 hs pi. Los resultados obtenidos se detallaron en la Tabla 8.

Tabla 8: Rendimiento de distintas cepas de virus Junín en presencia de glucosamina.

CEPA	CONCENTRACION DE GLUCOSAMINA (mM)	RENDIMIENTO VIRAL* UFP/ml
XJ	0	$5,8 \times 10^2$
	16	<5
XJC13	0	$2,5 \times 10^3$
	16	<5
Mones Cazón	0	$5,0 \times 10^2$
	16	<5

*determinado a las 24 hs pi

Las tres cepas probadas fueron inhibidas por la droga ya que no se

detectó infectividad en los sobrenadantes de los cultivos tratados con glucosamina.

Determinación de la etapa de la multiplicación del virus Junín más vulnerable a la acción de la glucosamina.

Ensayo in-vitro: La acción inhibitoria producida por la glucosamina en los cultivos infectados con virus Junín podría ser el resultado de una inactivación directa ejercida sobre el virus infectante. Con el objeto de determinar si ésta ocurría, se incubó una suspensión vírica de 5×10^4 UFP en medio HLS conteniendo 16 mM de glucosamina o en HLS solo durante 1 hora a 37°C. Al cabo de ese tiempo se diluyó convenientemente el material para diluir a la glucosamina a límites de concentración no activos. La actividad residual se tituló por la técnica de unidades formadoras de placas. En la Tabla 9 se resumieron los resultados obtenidos.

La suspensión viral tratada con 16 mM de glucosamina produjo el mismo número de placas que la suspensión control. De esta forma se descartó la posibilidad de un efecto directo de la droga sobre el virus Junín.

Pretratamiento de los cultivos con glucosamina: Los rendimientos obtenidos en presencia de distintas concentraciones de glucosamina (Figura I) mostraron que la droga bloqueaba significativamente la formación de partículas virales infecciosas pero en esos casos la droga había sido agregada después de la adsorción. A fin de analizar si sólo el tratamiento de

de las células con dichas concentraciones antes de la infección era suficiente para la inhibición o si se necesitaba la droga al comienzo del ciclo de replicación del virus se observó la evolución de la ACP de los cultivos infectados pretratados con medio HLS conteniendo 0,0;0,8;4,0; 8,0 y 16 mM de glucosamina.

El tratamiento de los cultivos con las distintas concentraciones de glucosamina 24 horas antes de la infección con virus Junín, no inhibió la replicación viral ya que todos los cultivos pretratados o no presentaron los primeros indicios de ACP al cuarto día post infección, alcanzando los días subsiguientes los niveles normales de positividad.

De estos datos se concluyó que la preincubación únicamente no era efectiva, se necesitaba la droga presente en una etapa posterior o durante la multiplicación viral

Etapas del ciclo viral sobre la que actúa la glucosamina: Con el fin de establecer la etapa de replicación bloqueada por la droga se trabajó de la siguiente forma: los cultivos de células Vero infectados con la cepa XJCl3 se trataron con 16 mM de glucosamina durante distintos períodos, 1, 5, 8 y 12 hs pi, al cabo de los cuales se lavaron los cultivos y se agregó medio HLS sin droga hasta completar las 24 hs pi, momento en el que se midió el virus liberado al extracelular. Simultáneamente se procesó otro grupo de cultivos infectados que recibieron la droga después de 4, 8 y 12 horas de iniciada la infección. El medio HLS conteniendo la droga se dejó hasta cumplir las 24 hs pi. En ese momento se determinó la infectividad de los sobrenadantes. Los resultados de ambos grupos se tabu-

laron en la Tabla 10.

La presencia de 16 mM de glucosamina durante la adsorción redujo en un 70% el rendimiento viral de 24 horas. Así mismo se observó una mayor inhibición a medida que se aumentó el tiempo de incubación con la droga.

Estos resultados indicaron un efecto ya a nivel de adsorción y penetración sin embargo las etapas más sensibles serían las comprendidas entre las 4 y 8 hs pi.

Efecto de la glucosamina después de varios ciclos de replicación: Para conocer si la glucosamina actuaba sobre la replicación del virus Junín una vez completado el ciclo, los cultivos infectados se mantuvieron en medio HLS sin droga por 24 ó 48 horas después de iniciada la infección. Transcurridos esos tiempos las células se trataron con glucosamina. A las 24 horas subsiguientes se midieron los rendimientos virales, los datos se representaron en la Figura V.

El tratamiento con 16 mM de glucosamina redujo un 95% (1,5 logaritmos) el rendimiento viral independientemente de que ésta se aplicará a las 24 ó 48 hs pi.

De esta forma se probó que la droga inhibe la replicación viral aún aplicada después del transcurso de varios ciclos de multiplicación.

Tabla 9: Efecto de la glucosamina sobre el virus Junín
in-vitro.

TRATAMIENTO	DILUCION		TITULO Log ₁₀ UFP/ml
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
ninguno	14'-9-10	0-0-2	5,74
16 mM gluco- samina	20-8-13	2-0-1	5,77

' número de placas obtenidas por cultivo.

Tabla 10: Acción de la glucosamina en distintos estadios de la multiplicación viral.

Tiempo de incubación en presencia de glucosamina (horas)	Rendimiento de virus extracelular' (UFP/ml)
0 (control)	$2,2 \times 10^4$
0 - 1 (adsorción)	$6,0 \times 10^3$
0 - 5	$1,5 \times 10^3$
0 - 8	$4,9 \times 10^2$
0 - 12	$1,2 \times 10^2$
0 - 24	< 5
4 - 24	< 5
8 - 24	$2,0 \times 10^2$
12 - 24	$1,5 \times 10^3$

' rendimiento medido a las 24 hs pi.

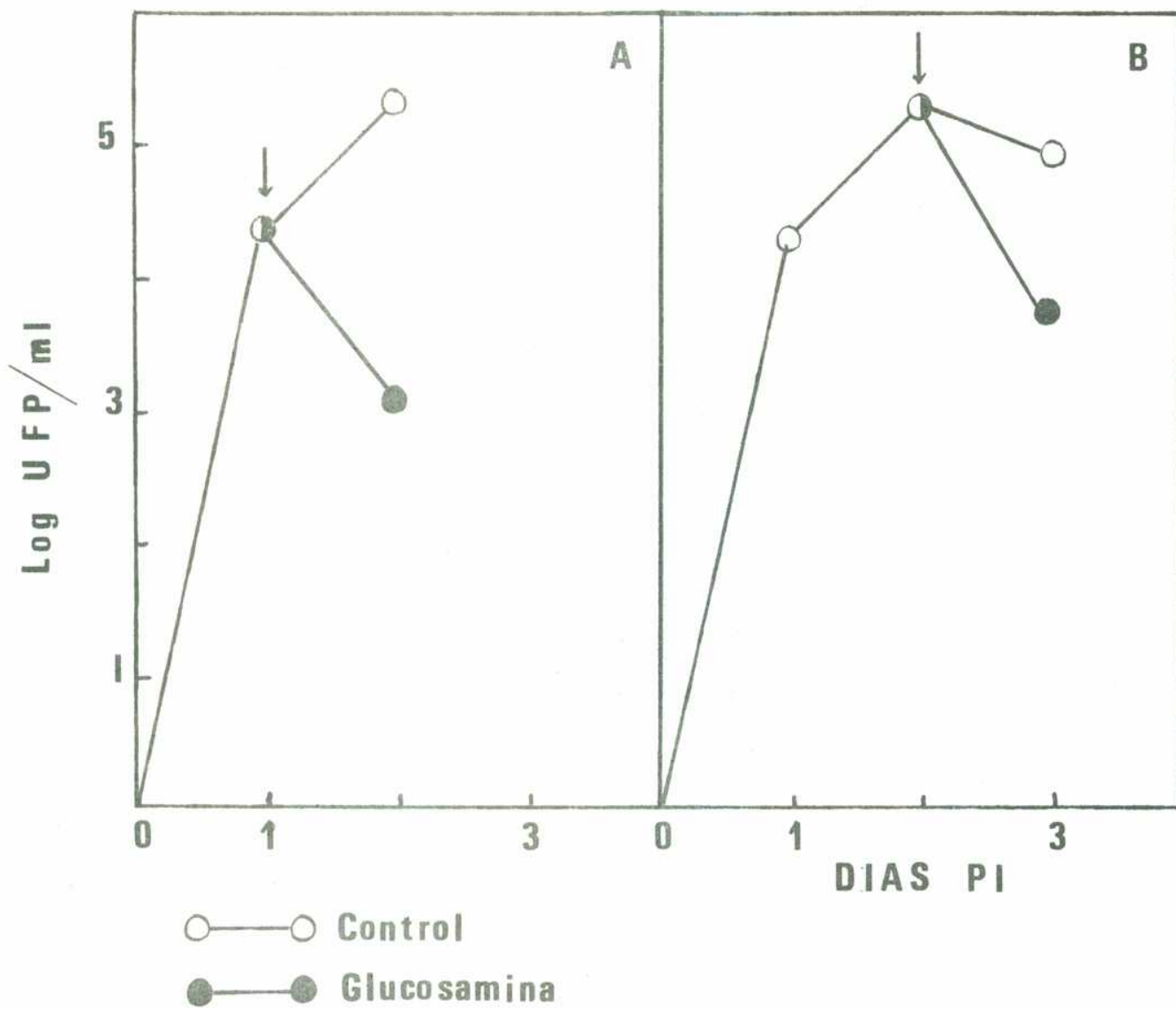


Figura V : Efecto de la glucosamina después de varios ciclos de replicación viral (A 24 hs pi, B 48 hs

Reversibilidad del efecto de la glucosamina

Para conocer la intensidad del daño producido por el tratamiento con la droga, se diseñó un experimento en el cual las células infectadas se mantuvieron con medio HLS conteniendo 16 mM de glucosamina. Al cabo de 24 horas de incubación a 37°C se retiraron los sobrenadantes y los cultivos se lavaron una vez con 2 ml de PBS. Inmediatamente se agregó medio HLS sin droga y se cosecharon alícuotas de los sobrenadantes a las 12, 24 y 48 horas post lavado para determinar el rendimiento viral. En estos cultivos se observó la evolución de la ACP durante 9 días (Figura VI).

La presencia del inhibidor durante las primeras 24 horas de infección no modificó ni el tiempo ni el grado de la ACP observada en los cultivos.

Los rendimientos virales obtenidos a las 24, 36, 48 y 72 hs pi se detallaron en la Tabla 11.

De esta manera se ha demostrado que el efecto bloqueador de la glucosamina se revierte por lavado ya que los cultivos no productores de viriones liberaron a las 12 horas de levantada la restricción partículas infecciosas.

Se comprobó además, que las células tratadas mantuvieron no sólo su viabilidad sino también la capacidad de producir virus.

Cinética de reversibilidad

Los datos de la Tabla 10 y los de reversibilidad (Figura VI y Tabla 11) indicaron que en presencia de glucosamina el virus conservó su integridad genética, indispensable para su replicación, ya que, como se indicó an-

teriormente se formaron viriones libres a partir de cultivos no productores. Sin embargo no se pudo establecer si el virus sólo penetró o si además prosiguió su proceso replicativo teniendo en cuenta que los rendimientos se determinaron a las doce horas post lavado y ese tiempo coincide con el encontrado para el ciclo de multiplicación del virus Junín.

Con el objeto de establecer el tiempo necesario para la formación de las partículas infecciosas a partir de cultivos infectados en presencia de la droga, se trabajó en las mismas condiciones que el experimento anterior tomando muestras a las 2,4 y 6 horas post lavado.

En la Figura VII se muestran los resultados obtenidos.

Las partículas infecciosas se detectaron asociadas a las células a las 4 horas post lavado mientras que en el extracelular se hallaron a las 6 horas de levantada la restricción.

La integración de todos estos resultados permitió conocer la cinética de la reversibilidad de la glucosamina (Figura VIII).

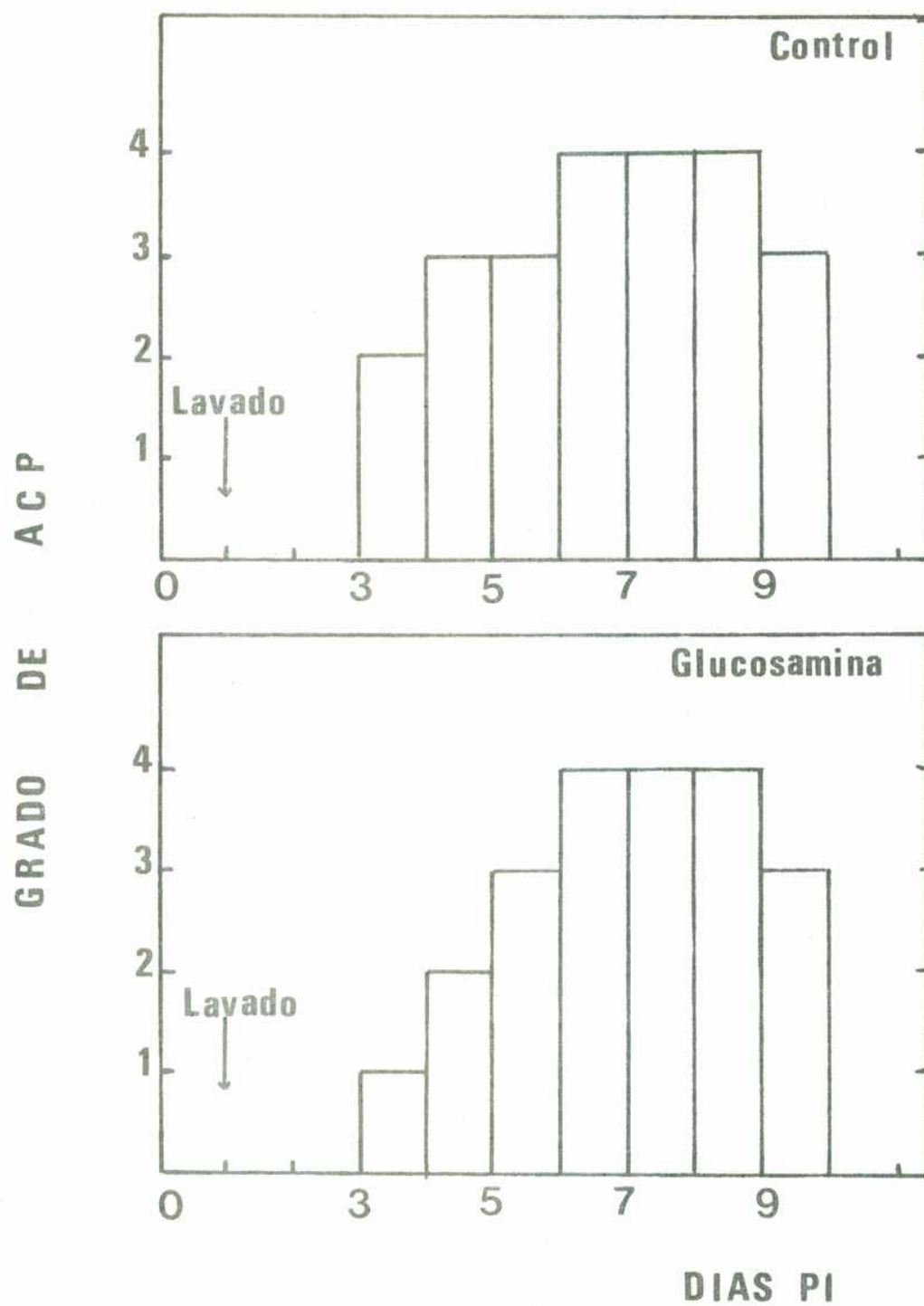


Figura VI : Evolución de la ACP después de 24 horas de tratamiento con 16 mM de glucosamina.

Tabla 11: Recuperación de la infectividad después de 24 horas de tratamiento con 16 mM de glucosamina.

Tiempo (horas post lavado)	RENDIMIENTO (log ₁₀ UFP/ml)	
	Control	Tratados
0	4,06	<5
12	4,30	3,30
24	4,65	4,14
48	5,32	4,17

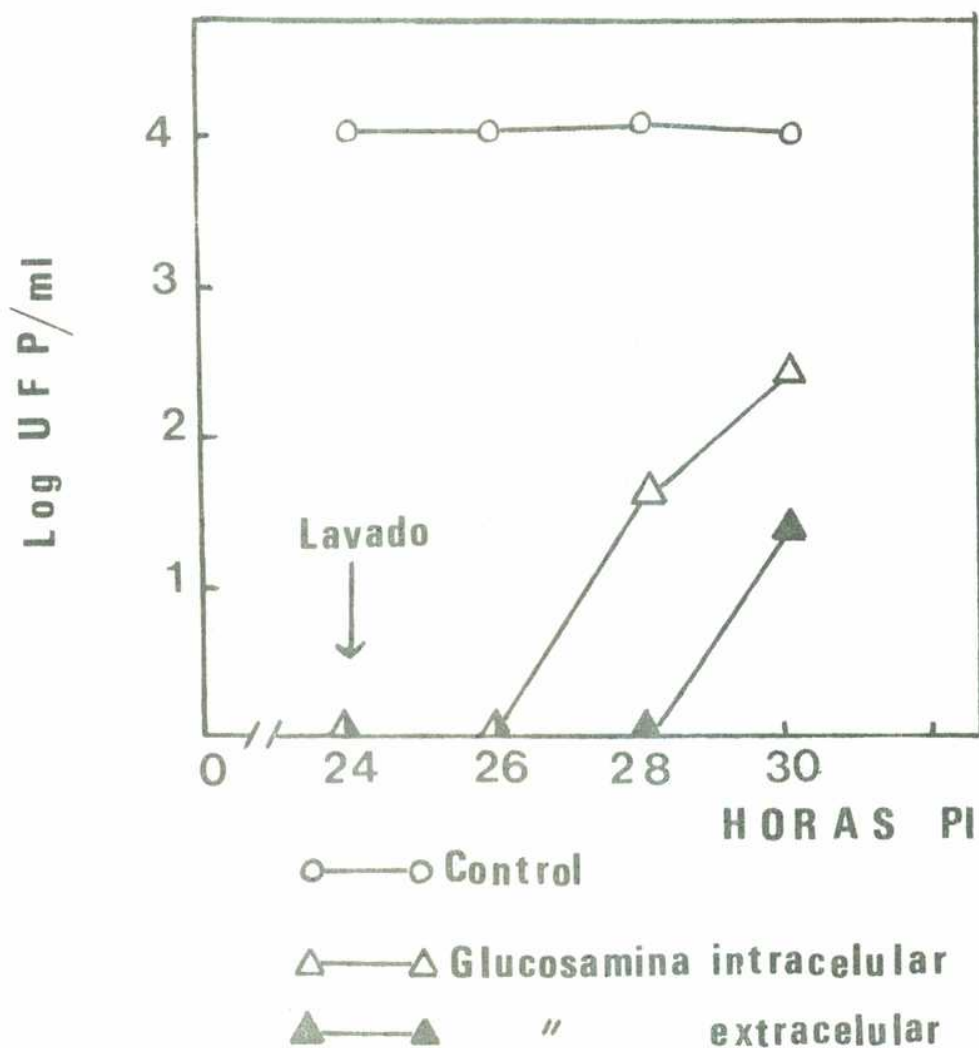
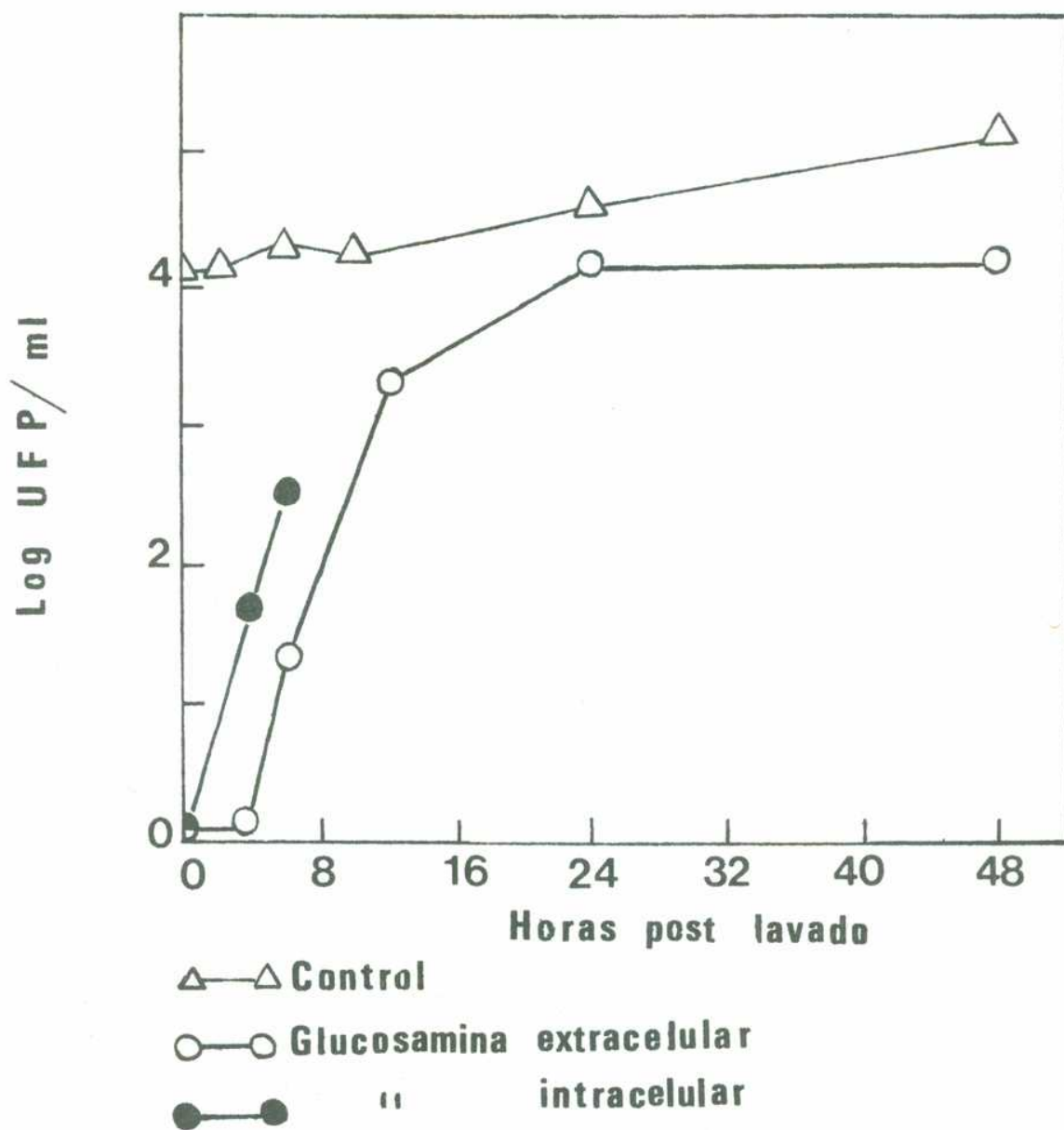


Figura VII : Reversibilidad de la acción de la glucosamina después de 24 horas de tratamiento.

Figura VIII : Cinética de reversibilidad del
efecto de la glucosamina.



Estabilidad de las estructuras sintetizadas en presencia de glucosamina.

Los experimentos anteriores permitieron concluir que el virus Junín, inicia su ciclo replicativo en presencia de glucosamina pero éste queda detenido en un estadio en el cual no se lo puede detectar por la técnica de formación de placas bajo agar.

A fin de determinar si los precursores virales eran degradados por la célula huésped se investigó la estabilidad de los mismos en tratamientos más prolongados. Con este fin las células infectadas se incubaron en medio HLS conteniendo 16 mM de glucosamina durante 24, 48, 72 y 96 hs pi. A los tiempos indicados se tomaron muestras de los sobrenadantes y las células se lavaron exhaustivamente con PBS. Luego se incubaron en medio HLS sin droga durante 24 horas más.

Se determinaron los rendimientos virales de las muestras pre y post-lavado. Los resultados se muestran en la Figura IX

Mientras la glucosamina estuvo presente, no se detectó infecciosidad en el medio extracelular de los cultivos (Figura IX A) pero al levantar la restricción todos los cultivos produjeron, 24 horas más tarde, rendimientos virales semejantes al control de 24 hs pi (Figura IX B).

La producción viral de los cultivos infectados en ausencia de la droga aumentó como consecuencia de nuevos ciclos de replicación viral mientras que en los tratados el nivel fue el mismo debido a que en ellos el virus inició un único ciclo.

La estabilidad observada permitió concluir que los precursores virales sintetizados en presencia de 16 mM de glucosamina estaban protegidos de las enzimas del huésped.

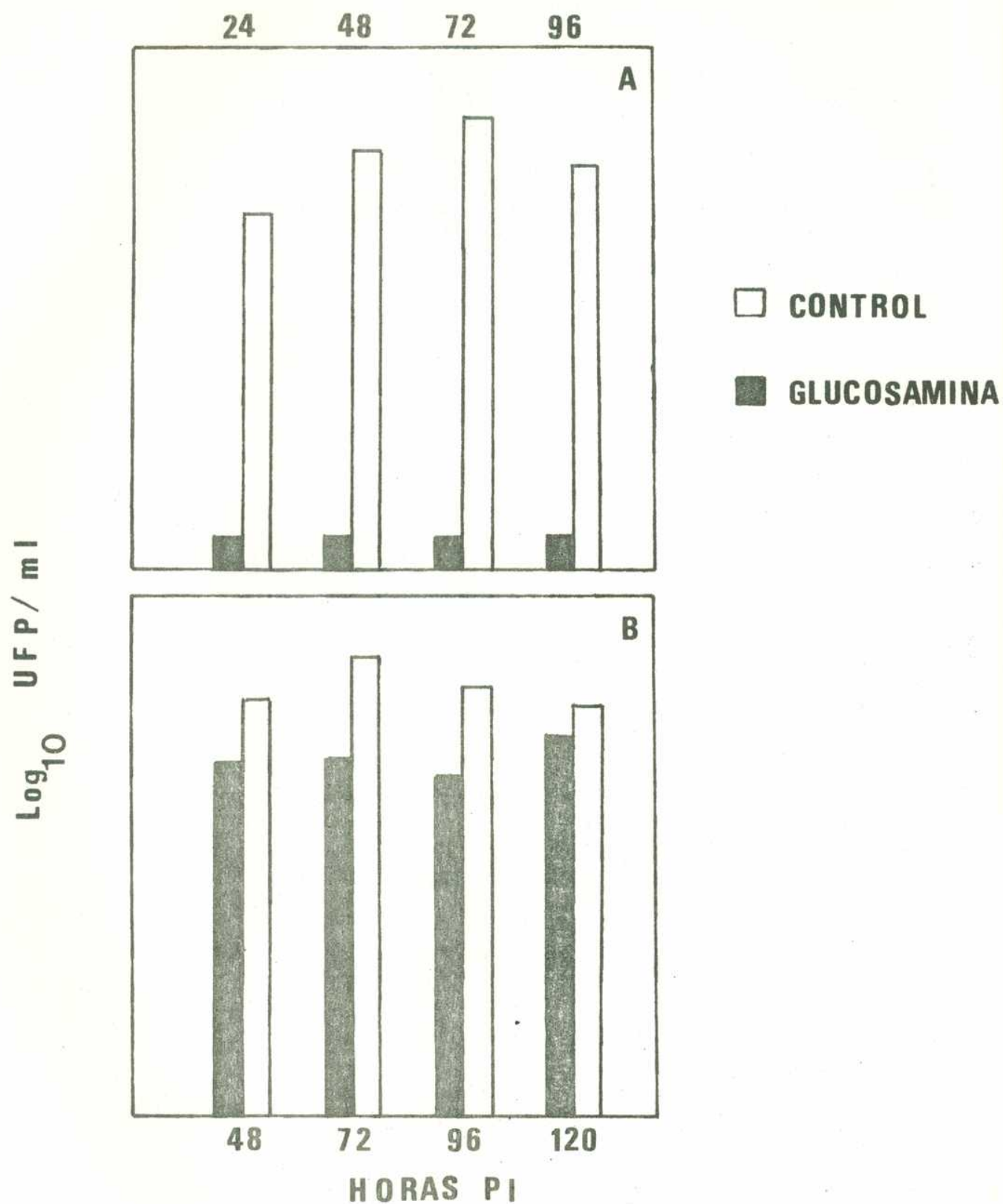


Figura IX : Estabilidad de las estructuras sintetizadas en presencia de 16 mM de glucosamina.

Síntesis de macromoléculas del huésped en presencia de glucosamina

El efecto de la glucosamina sobre la síntesis de ácido ribonucleico (ARN) y proteínas celulares se investigó en cultivos normales e infectados, tratados o no con 16 mM de glucosamina como se describió en Materiales y Métodos.

En las Figuras X y XI se muestra la cinética de incorporación de ^3H -UTP en la fracción ácido precipitable expresada como cuentas por minuto (cpm) por microgramo (μg) de proteína. Cada punto de las figuras representa el promedio de tres determinaciones.

Los cultivos normales incorporaron la radiactividad linealmente durante las primeras doce horas mientras que los cultivos tratados con 16 mM de glucosamina lo hicieron durante menos tiempo (8 horas). A partir de esos de esos tiempos la entrada de ^3H -UTP fue constante en ambos cultivos.

El tratamiento con el inhibidor produjo una disminución del 50% aproximadamente de la síntesis de ARN celular.

La infección con virus Junín aumentó la velocidad de síntesis de ARN aunque el nivel de incorporación de ^3H -UTP, a partir de las 8 horas fue menor que en los cultivos normales sin infectar.

En presencia del inhibidor las células infectadas incorporaron a las 24 horas un 30% de la radiactividad en comparación con los infectados en ausencia de droga.

En la Tabla 10 y Figura XII se detallaron los resultados de la síntesis proteica medida como incorporación de ^{35}S -metionina.

La incorporación de ^{35}S -metionina en las células Vero normales tratadas con 16 mM de glucosamina resultó en las primeras horas un 23% menor que las mismas células sin tratamiento.

A las 8 horas los valores de incorporación fueron similares para ambos cultivos independientemente del tratamiento con el inhibidor.

Los cultivos infectados, tratados o no, incorporaron el isótopo en la misma proporción (Figura XII).

De estos resultados se concluyó que la glucosamina no inhibió la síntesis proteica en las células Vero infectadas con la cepa XJC13.

En resumen estos resultados demostraron que en presencia de glucosamina no se detectan partículas virales asociadas a las células ni liberadas al medio extracelular señalando que la síntesis de viriones está bloqueada. Así mismo se comprobó que su efecto no se ejercía a nivel de adsorción o penetración sino en una etapa posterior.

Los ensayos de reversibilidad indicaron que las etapas tempranas de la replicación viral no eran afectadas sin embargo, fue difícil establecer el estadio tardío inhibido por la glucosamina.

Con el objeto de aclarar algo más el mecanismo de acción de la droga se investigó la síntesis de antígenos virales y la producción de partículas físicas.

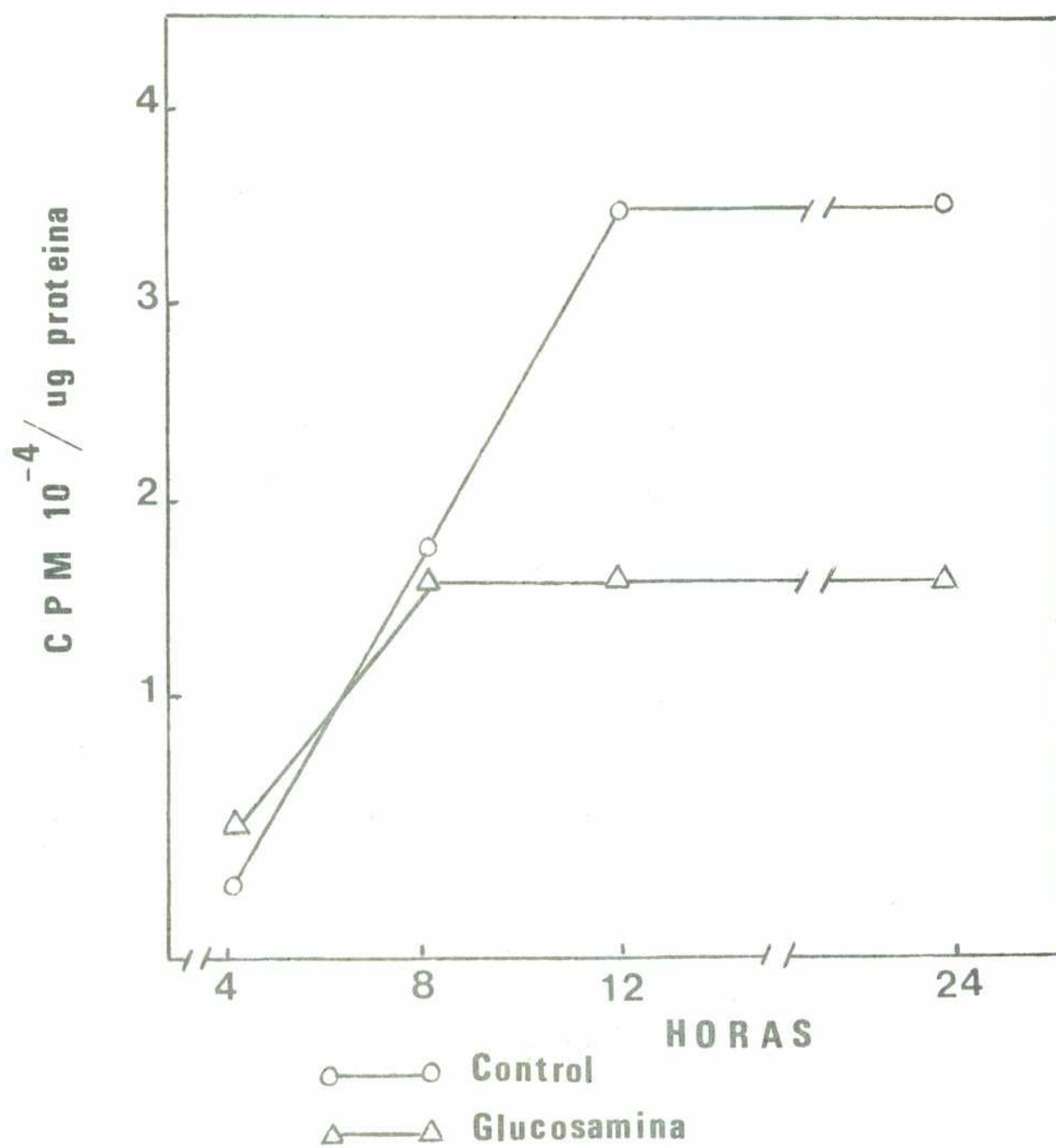


FIGURA X : SINTESIS DE ARN EN CELMLAS VERO NORMALES
EN PRESENCIA DE GLUCOSAMINA

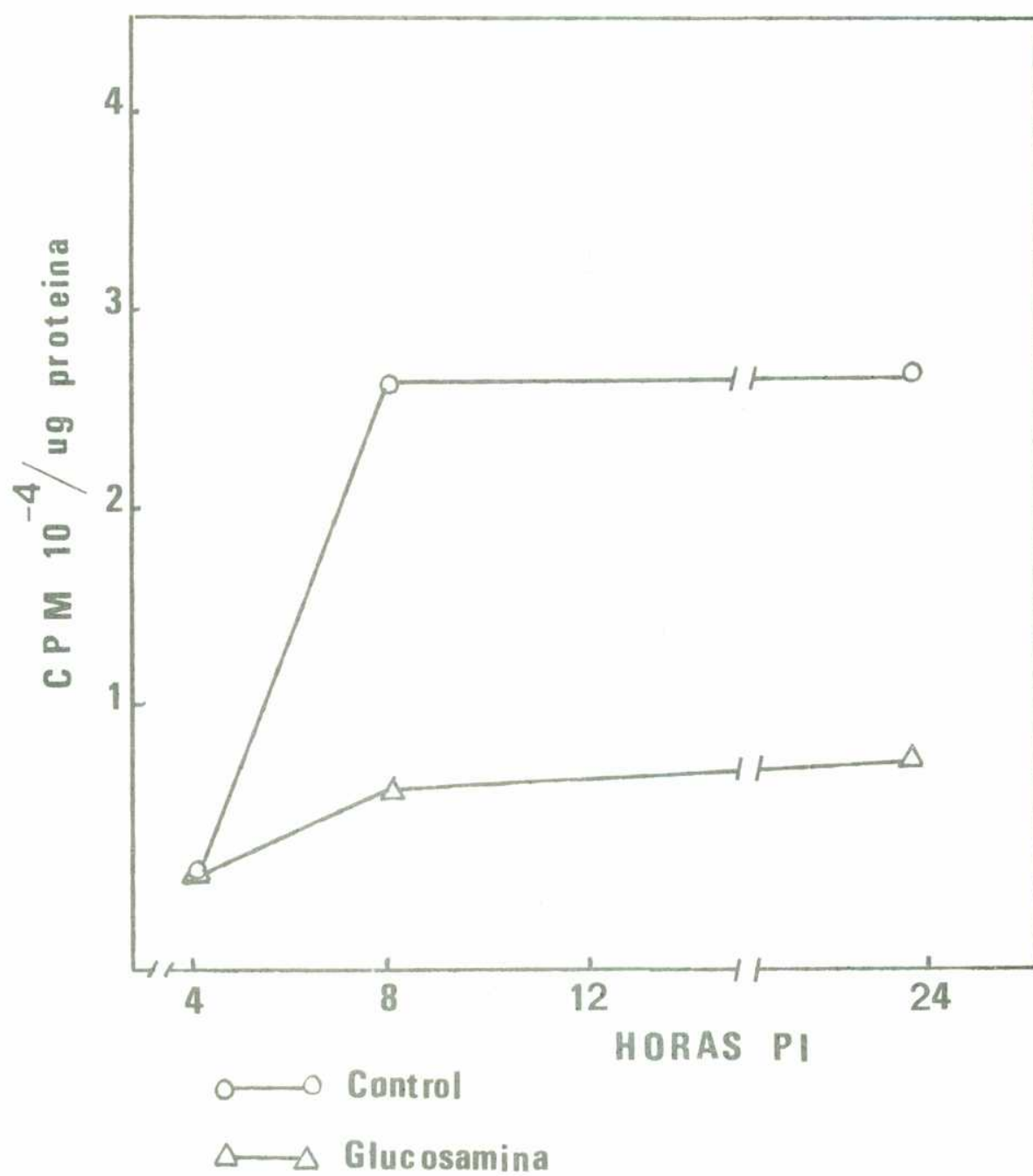


FIGURA XI : SINTESIS DE ARN EN CELULAS VERO INFECTADAS
EN PRESENCIA DE GLUCOSAMINA

Tabla 12 : Incorporación de ^{35}S -metionina en células Vero
normales en presencia de glucosamina.

Tratamiento	CPM/mg de proteína	
	4 hs	8 hs
ninguno	34.634	39.728
16 mM glucosamina	26.022	34.504

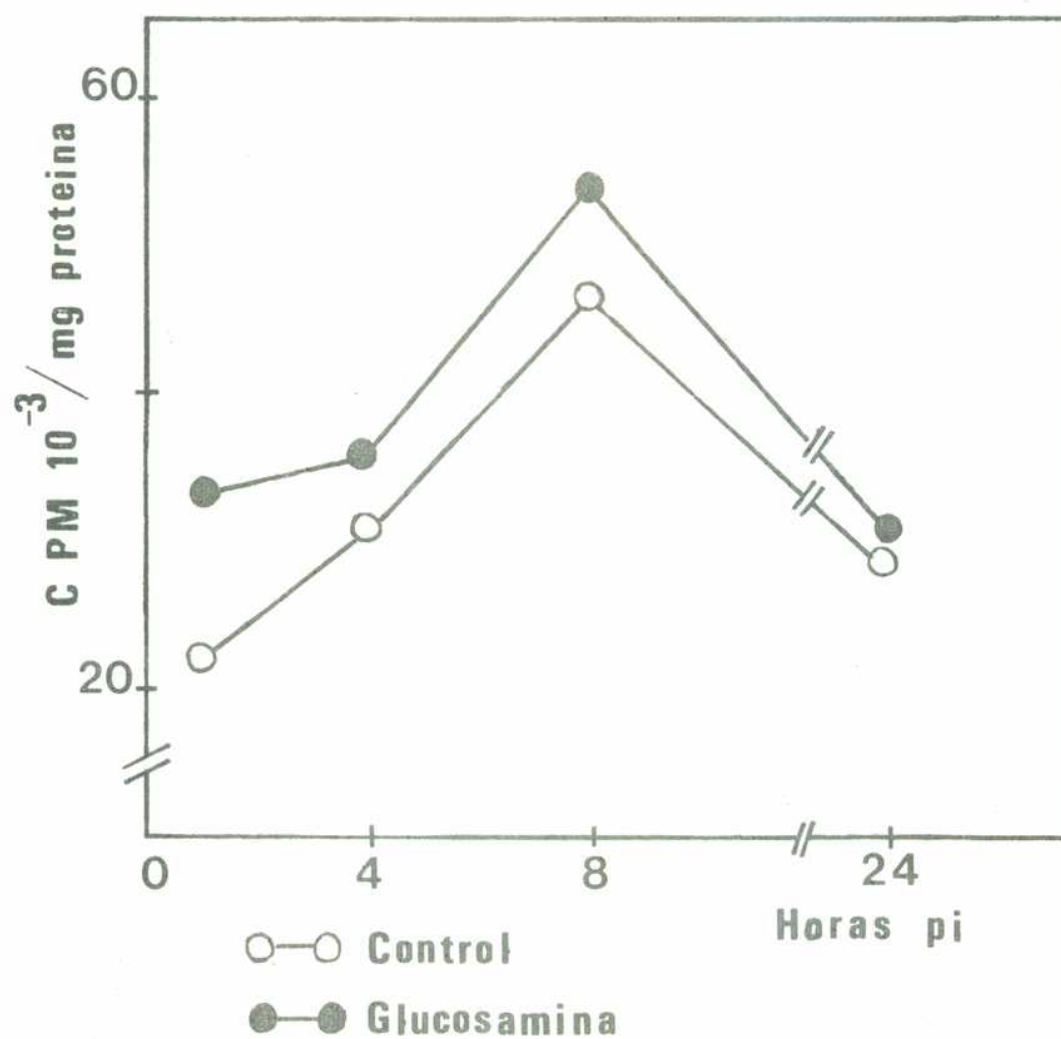


FIGURA XII : SINTESIS DE PROTEINAS EN CELULAS VERO
INFECTADAS EN PRESENCIA DE GLUCOSAMINA

Acción de la glucosamina sobre la síntesis de antígeno viral
y producción de partículas físicas.

Síntesis de partículas virales antigénicas: Los ensayos de inhibición demostraron que no hubo liberación de partículas infecciosas (viriones) en presencia de glucosamina, pero podría suceder que las partículas se formaran y carecieran de la capacidad de infectar una célula, como se ha demostrado para el virus Herpes Simplex (36) y para un oncornavirus murino (31) en presencia de 2-deoxi-D-glucosa.

Para esclarecer esta hipótesis se purificaron los sobrenadantes de los cultivos infectados con y sin tratamiento con glucosamina y se inocularon a conejos para la obtención de sueros hiperinmunes, como se describió en Materiales y Métodos.

La presencia de anticuerpos neutralizantes antiviral Junín (Tablas 13 y 14) se detectó por la prueba de neutralización que se realizó por las técnicas de reducción de placas bajo agar y por la inhibición de la ACP.

El inmunosuero C, diluido 1:80, neutralizó la capacidad infectante del virus Junín. Lo contrario ocurrió con el inmunosuero G, diluido 1:5, que se comportó como el suero normal de conejo.

La carencia de anticuerpos neutralizantes en el inmunosuero G indicó la ausencia de partículas antigénicas en los sobrenadantes de las células Vero infectadas con la cepa XJCl3 y tratadas con 10 mM de glucosamina.

Tabla 13. Detección de antígenos neutralizantes en los sueros C y G por reducción de placas bajo agar.

Mezcla	Promedio del número de placas por cultivo'	%Neutralización
XJC13 + suero normal 1:5	93	0
XJC13 + inmunosuero C 1:80	15	84
XJC13 + inmunosuero G 1:5	92	1

' obtenido de cinco cultivos.

Tabla 14: Detección de antígenos neutralizantes en los sueros C y G por inhibición de la ACP.

Mezcla	Título (log ₁₀ DICT50)	Log ₁₀ IN'
XJC13 + suero normal 1:5	6,50	0
XJC13 + inmunosuero C 1:80	4,50	2
XJC13 + inmunosuero G	6,50	0

' Log₁₀ IN calculado como el logaritmo del cociente entre el título del virus tratado con suero normal de conejo y el título del virus tratado con los inmunosueros C y G

Síntesis de antígenos virales en células tratadas con glucosamina

Las células infectadas producen como consecuencia de la replicación viral antígenos específicos detectables por inmunofluorescencia (IF).

Mediante estas técnicas se pueden marcar antígenos virales intracelulares sintetizados en el citoplasma de las células infectadas y fijadas con acetona. Así mismo es posible detectar antígenos virales localizados en la membrana citoplasmática, los cuales se observan en la superficie de las células infectadas sin fijar.

Con el objeto de estudiar si en presencia de glucosamina se bloqueaba la formación de los antígenos citoplasmáticos o el de superficie o ambos se procesaron cultivos como se describió en Materiales y Métodos.

En la Tabla 15 se resumen los resultados de una experiencia realizada con una relación virus-célula de 2:1.

Los porcentajes de antígenos citoplasmático o de superficie se determinó contando 500 células por cultivo.

Las células normales, con y sin tratamiento con glucosamina, no presentaron fluorescencia indicando que no hubo reacciones inespecíficas entre el inmunosuero y las células.

En las células infectadas se observó, en el citoplasma de las células fijadas, la presencia de antígeno viral fluorescente formando imágenes granulares que se iban haciendo más difusas con el transcurso de los días. Mientras que en las células viables se detectó en la superficie determinantes antigénicos como gránulos de forma irregular que fluorescían intensamente.

El porcentaje de células con antígeno de superficie aumentó con el transcurso de la infección(Tabla 15) mientras que el citoplasmático se mantuvo constante.

Los cultivos infectados y tratados con 16 mM de glucosamina presentaron antígeno citoplasmático de las mismas características que los cultivos infectados sin tratar, aunque los porcentajes fueron algo inferiores.

No se visualizó antígeno de superficie en estas células, infectadas y tratadas con la droga, en ninguno de los tiempos ensayados(Tabla 15).

Los rendimientos virales de estos cultivos se determinaron por UFF y se detallaron en la Tabla 16.

Nuevamente no fue posible detectar virus infeccioso en los sobrenadantes de los cultivos tratados con glucosamina. Los cultivos infectados sin tratar mostraron los niveles normales de producción viral.

Se estudiaron células infectadas con distintas multiplicidades de infección obteniéndose resultados similares a los presentados.

Tabla 15: Síntesis de antígeno citoplasmático y de superficie
en presencia de glucosamina.

Tiempo'	% antígeno citoplasmático''		% antígeno de superficie''	
	control	tratado	control	tratado
24	33	11	7	0
48	30	18	24	0
72	30	24	30	0

' horas post adsorción.

'' se determinó contando 500 células por preparado.

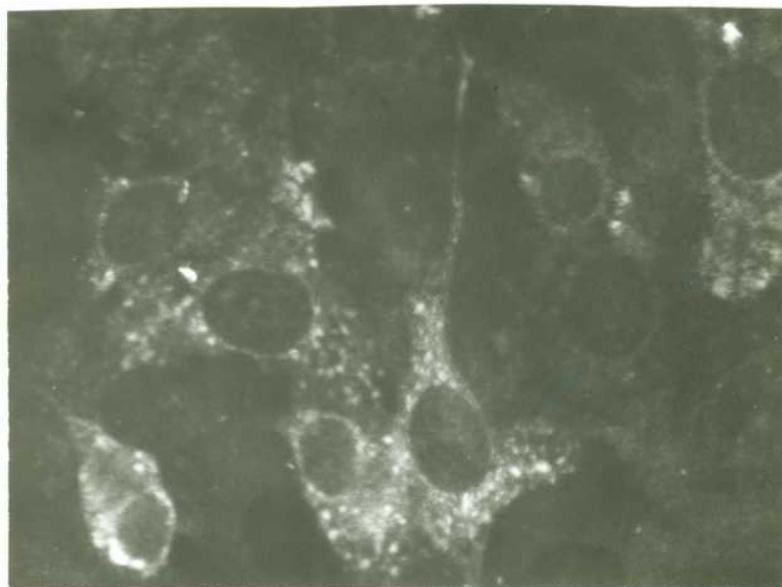
Tabla 16: Rendimiento de virus Junín en presencia de glucosamina.

Tiempo (hs pi)	Rendimiento viral (UFP/ml)	
	control	tratado
24	$2,4 \times 10^3$	< 5
48	$2,2 \times 10^4$	< 5
72	$1,3 \times 10^5$	< 5

La presencia de antígeno citoplasmático en los cultivos infectados y tratados con glucosamina demostró que el virus inició su ciclo replicativo pero no se liberó al medio extracelular lo que explica la ausencia de antígeno de superficie.

Estos hallazgos confirmaron los experimentos preliminares en los cuales se había observado el mismo efecto.

En las Fotografías 1, 2 y 3 se observan los antígenos citoplasmáticos detectados por IF en las células Vero infectadas con virus Junín, cepa XJCL3, con y sin tratamiento con glucosamina.



Fotografía 1: Antígeno citoplasmático en células Vero infectadas con virus Junín a las 48 hs pi (500 X)



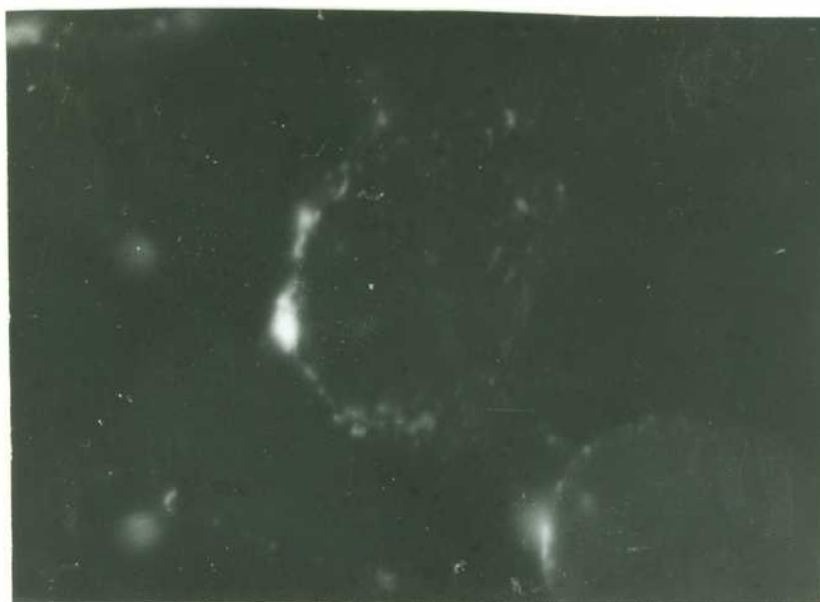
Fotografía 2: Antígeno citoplasmático sintetizado
en células Vero infectadas con virus
Junín. Aumento 1000 X.



Fotografía 3: Antígeno citoplasmático sintetizado en
presencia de glucosamina (500 X).

En las tres fotografías se observaron gránulos intensamente fluorescentes. La imagen presentada por cada uno de los cultivos resultó idéntica, sin variaciones en la intensidad ni en la distribución de los gránulos.

En la Fotografía 4 se observa el antígeno de superficie presentado por las células Vero infectadas sin tratar con glucosamina.



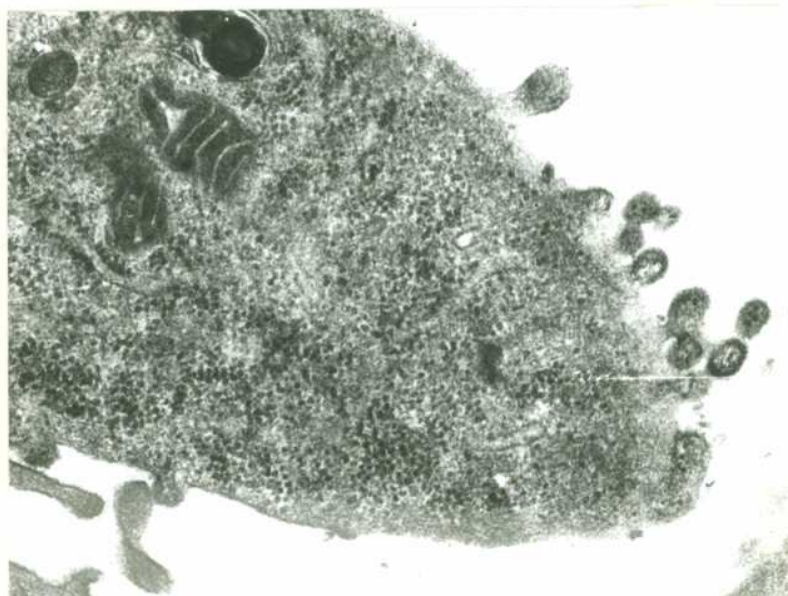
Fotografía 4: Antígeno de superficie en células Vero infectadas con virus Junín (1000 X).

Sobre la membrana de las células infectadas se visualizó gránulos brillantes de forma irregular.

Formación de partículas físicas en cultivos tratados con glucosamina

Los cultivos de células Vero infectados con una alta dosis de virus Junín, cepa XJC13, aproximadamente 100 UFP por célula se procesaron para microscopía electrónica como se detalló en Materiales y Métodos.

La Fotografía 5 muestra partículas virales brotando de la membrana citoplasmática de una célula infectada con virus Junín.



Fotografía 5: Fotomicrografía electrónica de células Vero infectadas con virus Junín

La fotomicrografía electrónica muestra una célula Vero después de 72 horas de infección con el virus Junín. En la superficie de la misma se observan partículas brotando y otras libres en el medio extracelu-

lar. La morfología de estas partículas correspondió a las típicas descritas para los Arenavirus(63-66).

En las células infectadas se observó un aumento en la cantidad de ribosomas y alteraciones morfológicas en las mitocondrias.

En las células infectadas y tratadas con 16 mM de glucosamina no se observó la presencia de estructuras relacionadas con partículas virales ni en la membrana externa de las células ni en el medio extracelular. Estas conclusiones se obtuvieron después de observar 500 células infectadas con y sin tratamiento con glucosamina.

P A R T E I I I

ACCION DE LA GLUCOSAMINA SOBRE OTROS ARENAVIRUS

Se determinó el efecto de la glucosamina sobre la replicación de los virus Tacaribe y Pichindé.

Virus Tacaribe

Células Vero infectadas con virus Tacaribe se trataron con medio HL₂ conteniendo 16 mM de glucosamina durante 24 horas a 37°C. Al finalizar el tratamiento se midió el rendimiento viral por la técnica de unidades formadoras de placas (Tabla 17)

Tabla 17: Rendimiento de virus Tacaribe en presencia de glucosamina.

Tratamiento	Rendimiento viral' (UFP/ml)
ninguno	$8,0 \times 10^2$
16 mM glucosamina	< 5

'medido a las 24 hs pi.

La glucosamina impidió la producción de partículas infecciosas tal

P A R T E I V

ACCION DEL BI Y LA GLUCOSAMINA SOBRE LOS VIRUS JUNIN Y TACARIBE IN VIVO

Los compuestos de mayor actividad antivirüs Junín in-vitro se ensayaron en diferentes animales de laboratorio a fin de determinar su valor terapéutico in-vivo.

Selección del huésped apropiado.

El virus Junín multiplica en diversos animales de laboratorio como ser cobayo, hámster, ratón y rata.

Los cobayos son los más usados porque reproducen en forma experimental la enfermedad que el virus produce en los seres humanos.

La inoculación de la cepa prototipo, XJ, causa en el cobayo un cuadro hemorrágico característico dado por la aparición de petequias en las mucosas, plaquetopenia, leucopenia y variaciones en el sedimento urinario con una acidificación creciente de la orina(67). Los animales pierden peso en forma continua, se aísla virus de ganglios y plasma y mueren entre los días 11 y 15 post inoculación(37).

La susceptibilidad del ratón frente a la infección con virus Junín es independiente de la cepa de ratón y de la dosis de virus, sin embargo depende de la edad del mismo(68).

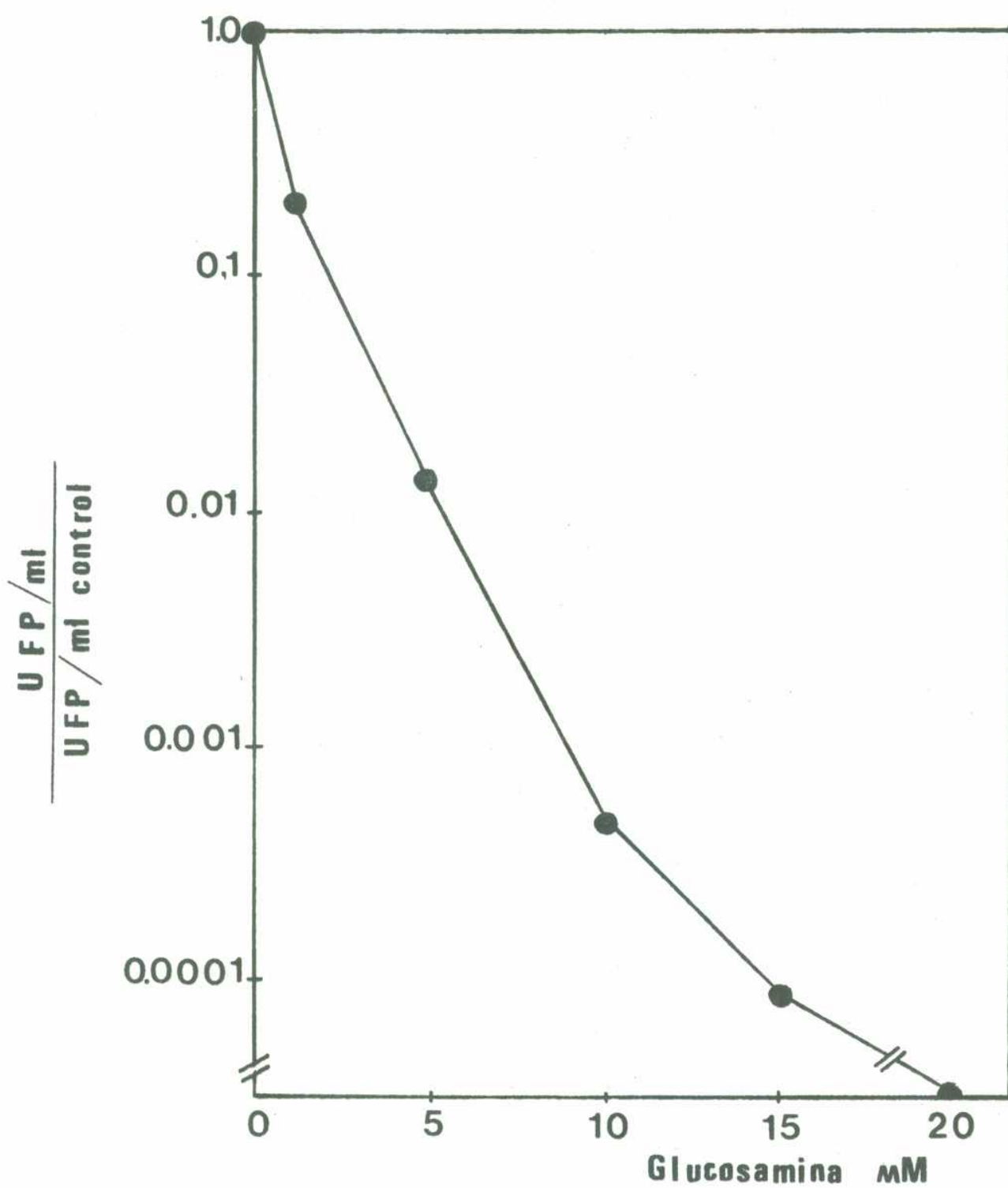


Figura XIII: Rendimiento de virus Tacaribe en presencia de concentraciones crecientes de glucosamina.

Tabla 18: Rendimiento de virus Tacaribe en presencia de
16 mM de glucosamina en células RK13.

Tratamiento	Rendimiento' (UFP/ml)	% Inhibición
ninguno	$5,0 \times 10^4$	0
16 mM glucosamina	$1,0 \times 10^3$	98

' rendimiento viral determinado a las 30 hs pi.

Virus Pichindé

Los datos de la Tabla 19 muestran la inhibición observada al tratar los cultivos infectados con virus Pichindé con 16 mM de glucosamina.

Tabla 19: Rendimiento de 24 y 48 hs pi de virus Pichindé en presencia de 16mM de glucosamina.

Tratamiento	Rendimiento viral (UFP/ml)	
	24 hs pi	48 hs pi
ninguno	$6,3 \times 10^3$	$1,1 \times 10^5$
16 mM glucosamina	< 5	< 5

Los cultivos infectados con virus Pichindé y tratados con glucosamina no presentaron ninguna alteración morfológica (ACP), sin embargo el virus se mantuvo viable ya que dichos cultivos produjeron, 24 horas más tarde $3,4 \times 10^2$ UFP/ml al levantarse la restricción.

Los ensayos de reversibilidad realizados en los cultivos infectados con virus Pichindé y tratados con el inhibidor confirmaron la estabilidad de los precursores virales tal como ocurrió con el virus Junín.

P A R T E I V

ACCION DEL BI Y LA GLUCOSAMINA SOBRE LOS VIRUS JUNIN Y TACARIBE IN VIVO

Los compuestos de mayor actividad antivirüs Junín in-vitro se ensayaron en diferentes animales de laboratorio a fin de determinar su valor terapéutico in-vivo.

Selección del huésped apropiado

El virus Junín multiplica en diversos animales de laboratorio como ser cobayo, hámster, ratón y rata.

Los cobayos son los más usados porque reproducen en forma experimental la enfermedad que el virus produce en los seres humanos.

La inoculación de la cepa prototipo, XJ, causa en el cobayo un cuadro hemorrágico característico dado por la aparición de petequias en las mucosas, plaquetopenia, leucopenia y variaciones en el sedimento urinario con una acidificación creciente de la orina(67). Los animales pierden peso en forma continua, se aísla virus de ganglios y plasma y mueren entre los días 11 y 15 post inoculación(37).

La susceptibilidad del ratón frente a la infección con virus Junín es independiente de la cepa de ratón y de la dosis de virus, sin embargo depende de la edad del mismo(68).

El ratón lactante desarrolla una enfermedad del sistema nervioso central que le causa la muerte, mientras que el ratón adulto inoculado con la misma dosis y por la misma vía resiste la infección sin signos clínicos(69).

La enfermedad neurológica que mata al ratón recién nacido se debe a un fenómeno inmunológico producido por la invasión masiva de leucocitos en el sistema nervioso central(70), mientras que en el ratón adulto el virus Junín induce un estado de sensibilización de tipo celular que no produce manifestaciones clínicas(71).

En los hámsters recién nacidos la infección por virus Junín origina un cuadro agudo con localización del antígeno viral y virus infeccioso en los órganos linfáticos, hígado, cerebro y pulmón. En cerebro la concentración de antígeno aumenta hasta el día de muerte que ocurre alrededor del día 12 post inoculación(72).

El virus Junín, cepa XJ, produce un 100% de mortalidad en ratas recién nacidas. Este valor disminuye gradualmente a partir de los 12 días aproximadamente, como ocurre con el ratón(73).

Para determinar la eficacia de una droga in-vivo es necesario elegir un modelo que permita detectar la replicación del virus y al mismo tiempo al que se le pueda administrar el antiviral en estudio preferentemente por vía oral.

La elección del animal óptimo para realizar un ensayo con drogas antivirales y virus Junín no es fácil.

El animal más apropiado parece ser el cobayo por la forma en que reproduce la enfermedad y por la facilidad de administración por vía oral. Sin embargo este animal no se seleccionó debido a que en los ensayos preliminares los compuestos administrados resultaron excesivamente tóxicos para los mismos. Además existían datos en la bibliografía acerca de la elevada sensibilidad de los cobayos frente a diferentes drogas(17).

El virus Tacaribe, relacionado antigénicamente con el virus Junín (74) produce un 100% de mortalidad en los ratones recién nacidos infectados experimentalmente. Esta sensibilidad no se altera hasta los 11 días disminuyendo luego gradualmente.

La mortalidad a los 20 días de edad es de un 60 a 80% (75) a diferencia del virus Junín que sólo mata al 20% de los animales. La mayor parte de los experimentos se realizaron con el virus Tacaribe porque se consideró apropiado el porcentaje de mortalidad. Estos animales pueden alimentarse por sí mismos lo que facilita la administración de la droga. En los más pequeños los tratamientos por vía oral se ven entorpecidos por el hecho de ser lactantes.

B IToxicidad del BI para los ratones

Para determinar la toxicidad del BI a un grupo de 20 ratones de 20 días de edad se les administró 0,5 mg/ml de BI en el agua durante 14 días, midiéndose todos los días el volumen de agua ingerido.

Un grupo de características similares pero al que no se le administró droga sirvió como control.

Como índice de toxicidad se determinaron las variaciones en las curvas ponderales pesando los animales durante 30 días. Además se consideró la supervivencia de los animales tratados. La Figura XIV muestra las curvas obtenidas.

La evolución de los pesos en ambos grupos, tratados y sin tratar, fue casi idéntica, aunque un 30% de los animales tratados murió entre los 9 y 13 días después de iniciado el tratamiento por lo que se decidió que los animales infectados serían tratados durante 9 días o menos.

Administración de BI a ratones infectados con virus Tacaribe

Los ratones se anestesiaron levemente antes de ser inoculados por vía intracerebral (ic) con 10 DL50 para ratón de virus Tacaribe.

El tratamiento consistió en la administración de 0,5 mg/ml de BI durante 9 días. La droga se renovó cada tres días y una vez finalizado el tratamiento se les administró agua sin droga.

Los animales se pesaron diariamente y se registró la mortalidad

ocurrida en cada grupo (Figuras XV Y XVI)

La administración de BI (0,5 mg/ml) no modificó las curvas ponderales obtenidas para los distintos grupos indicando que la evolución de los pesos fue independiente del tratamiento.

El tratamiento con esa dosis de BI redujo significativamente la mortalidad de los ratones inoculados con virus Tacaribe.

Los ratones de ambos grupos, tratados o no, murieron entre los 8 y 11 días post inoculación.

A fin de establecer si otros tratamientos con la droga también protegían a los animales infectados con virus Tacaribe se repitió el experimento variando la concentración de BI o el tiempo de administración

Se trabajó con cinco grupos de 30 ratones cada uno inoculados con 10 DL50 de virus Tacaribe. Las concentraciones suministradas fueron : 0; 0,25; 0,5 y 1,0 mg/ml de BI durante 9 días. El quinto grupo se trató con 0,5 mg/ml de BI pero durante sólo 7 días.

La concentración de 1,0 mg/ml se ensayó para poder establecer si los animales resistían completamente a la infección.

En la Figura XVII se observan las curvas de mortalidad de los distintos grupos.

La inoculación con 10 DL50 para ratón de virus Tacaribe resultó letal para el 80% de los animales infectados. La mortalidad de los ratones tratados con 0,5 mg/ml de BI se redujo al 10%.

La dosis de 0,25 mg/ml no protegió a los animales mientras que la

dosis de 1,0 mg/ml potenció el efecto de la infección ya que el 100% de los animales murió al décimo día post inoculación.

Administración de BI a ratones infectados con virus Junín

El tratamiento más efectivo, tomando como base los datos obtenidos con el virus Tacaribe, se ensayó en ratones inoculados con virus Junín.

Grupos de 25 ratones cada uno de 20 días de edad se inocularon por vía ic con 10 DL50 para ratón de virus Junín, cepa XJ o XJC13.

Los animales infectados se trataron con 0,5 mg/ml de BI en forma oral durante 9 días. Diariamente se registró la evolución de los pesos y la mortalidad de los distintos grupos.

Los grupos control y tratados, para cada cepa viral, presentaron los mismos valores de mortalidad (59% para el grupo control inoculado con la cepa XJ y 49% para el tratado; el otro grupo control, inoculado con XJC13, presentó un porcentaje de mortalidad de 61% y el tratado de 54%) indicando que la droga no evitó el desenlace de la enfermedad.

Las experiencias se repitieron tres veces obteniéndose siempre los mismos resultados o sea valores de mortalidad algo inferiores para los animales tratados, alrededor de un 10%, que no se consideró significativo.

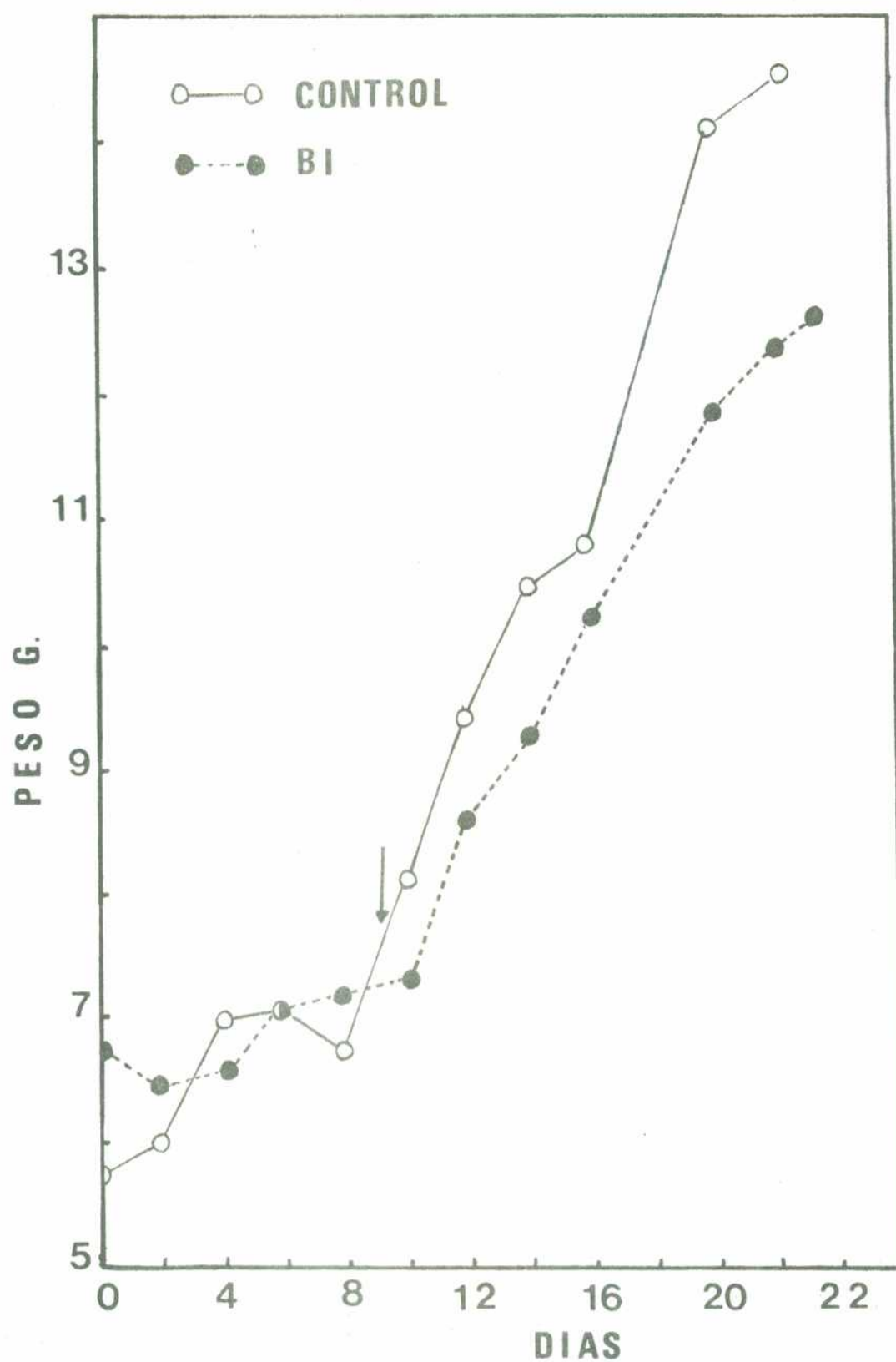


FIGURA XIV : EVOLUCIÓN DEL PESO DE LOS RATONES NORMALES

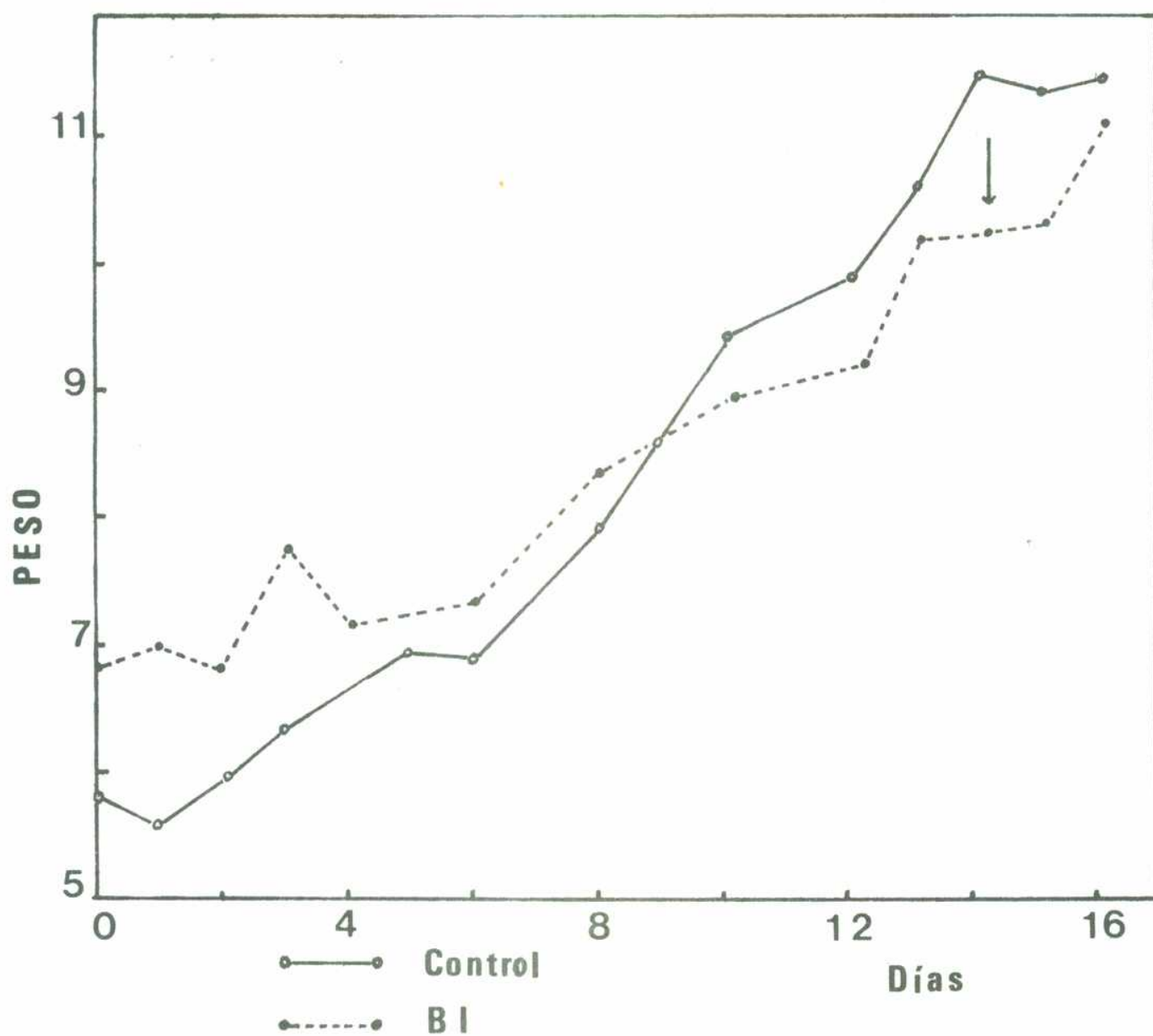


FIGURA XV : EVOLUCION DEL PESO DE LOS RATONES INFECTADOS
CON VIRUS TACARIBE, CON Y SIN TRATAMIENTO.

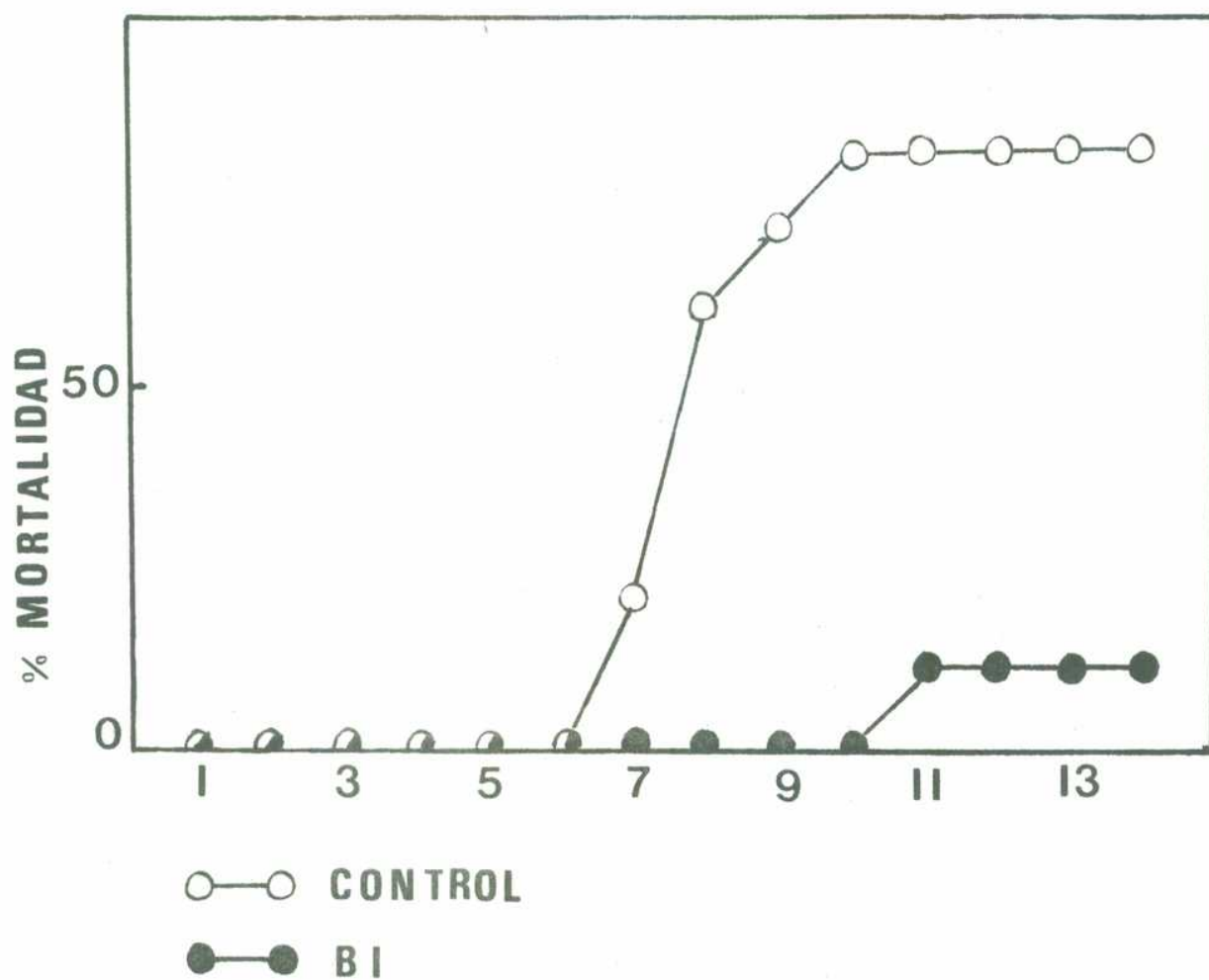


FIGURA XVI: MORTALIDAD DE RATONES INFECTADOS CON VIRUS TACARIBE CON Y SIN TRATAMIENTO

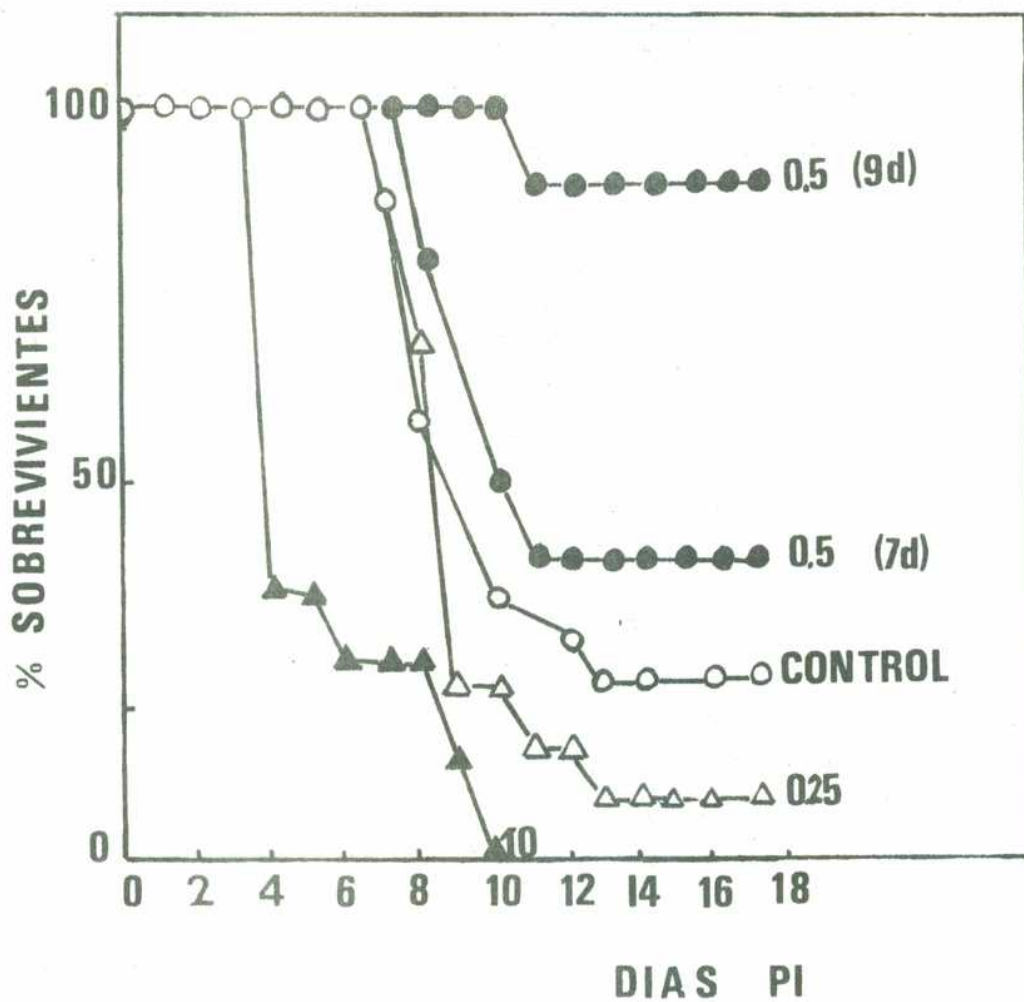


FIGURA XVII : MORTALIDAD COMPARADA DE RATONES INOCULADOS CON VIRUS TACARIBE Y TRATADOS ORALMENTE CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE BT.

Glucosamina

Toxicidad de la glucosamina para ratones

Para determinar la toxicidad de la glucosamina a un grupo de 18 ratones de 7 días de edad se le inoculó diariamente por vía intraperitoneal 0,5 mg/ml de droga en medio isotónico. Otro grupo de características similares al que se le inyectó el diluyente sirvió como control.

La inoculación se realizó durante cuatro días y se registró el peso de los animales durante 10 días.

Los incrementos de pesos fueron idénticos para ambos grupos no presentando el grupo tratado ninguna manifestación tóxica.

La administración de 0,5 mg/ml de glucosamina en forma oral se realizó en un grupo de 20 ratones de 20 días de edad durante 10 días.

Los animales tratados y controles aumentaron de peso normalmente sin observarse variaciones entre ellos.

Administración de glucosamina a ratones inoculados con virus Tacaribe

La inoculación se realizó con 10 ó 100 DL50 para ratón de virus Tacaribe de acuerdo a la vía de infección.

La administración de glucosamina se efectuó por diversas formas a fin de encontrar la más útil para combatir la infección experimental.

El tratamiento por vía intraperitoneal de 0,5 mg/ml de glucosamina durante cuatro días no protegió a los ratones inoculados por ic o ip. Los animales de ambos grupos, tratados o no, murieron con cuadro típico entre los días 10 y 15 post inoculación.

El tratamiento por vía oral con la misma dosis de glucosamina no arrojó ningún resultado ya que no se produjo la muerte de los animales inoculados intranasalmente con 100DL50 para ratón de virus Tacaribe.

El mismo tratamiento careció de valor terapéutico en ratones de 20 días de edad inoculados por vía ic con 10 DL50 para ratón de virus Tacaribe. No hubo diferencias significativas entre la mortalidad de ambos grupos de ratones (60% para los controles y 62% para los tratados).

Administración de glucosamina a ratas

En estos experimentos se usaron ratas de 10 días de edad en las cuales el virus Junín produce un 100% de mortalidad.

Grupos de 15 ratas de 10 días de edad se inocularon por vía ic con 10 DL50 para rata de virus Junín, cepa XJ.

El tratamiento consistió en la administración diaria de 1,0 mg/ml de glucosamina por vía intraperitoneal hasta el décimo día observándose que los animales de cualquiera de los grupos, tratados o no, morían simultáneamente dentro de los plazos previstos con la sintomatología propia.

Estos resultados indicarían que la glucosamina carece de valor terapéutico in-vivo sin embargo, teniendo en cuenta la velocidad de metabolización de la glucosamina en el organismo debe ocurrir que el nivel necesario de droga para el bloqueo viral no se alcance o que la glucosamina no llegue como tal al sitio donde ocurre la replicación del virus. Sería apropiado, para evitar en parte estos problemas, la copulación con alguna molécula que le impidiera metabolizarse rápidamente. Durante la ejecución de este trabajo no se realizaron tales intentos.

D I S C U S I O N

ANALISIS COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRUS JUNIN DE DIFERENTES COMPUESTOS.

El estudio comparativo de las cinco drogas ensayadas indicó que tres de ellas inhibieron significativamente la replicación del virus Junín en cultivos de células Vero. Estos compuestos fueron el derivado soluble del bis-bencimidazol (BI), la 2-deoxi-D-glucosa y la glucosamina.

La amantadina y la rimantadina no produjeron, en la concentración utilizada (40 ug/ml), niveles significativos de inhibición. Sin embargo ambos compuestos prolongaron en dos días el período de latencia en la aparición de los efectos citopáticos que el virus induce en las células como consecuencia de su replicación. Coto y col. (8) trabajando con la cepa patógena señalaron el mismo resultado para la amantadina.

La cuantificación de estos ensayos demostró que los rendimientos virales de cultivos infectados con y sin tratamiento con amantadina y rimantadina eran idénticos (Figura I) indicando además que ambas drogas carecieron de actividad antiviral.

Resultados similares se obtuvieron al realizar las curvas de crecimiento viral en presencia de 40 ug/ml de los compuestos. En ellas

la replicación viral estuvo por debajo de los valores del control (Figura II) pero esa disminución quedó comprendida en el intervalo de error del método.

Los índices terapéuticos (Tabla 8) confirmaron la poca actividad de ambas drogas. Sin embargo considerando los resultados obtenidos con la cepa patógena (8) habría para cada cepa un comportamiento diferente frente a la amantadina.

Estos resultados no coincidieron con los obtenidos por Welsh y col. (6) que trabajando con distintas cepas del virus LCM demostraron que la amantadina poseía un marcado efecto antiviral. Probablemente un factor muy importante y decisivo en estas diferencias de comportamiento entre Arnavirus fue el empleo de concentraciones más elevadas. Ellos usaron una dosis de 100 ug/ml de droga la cual no lesionó los cultivos de células BHK o células L durante los tiempos de experimentación (6). Sin embargo para el sistema celular empleado en esta investigación se encontró que concentraciones de 50 ug/ml o mayores producían cambios morfológicos después de 48 horas de incubación a 37°C (8).

En relación al BI se encontró que para actuar como antiviral debía estar presente mucho tiempo antes de la infección, 24 horas de pretratamiento, y durante la misma para ser efectiva; este hecho también fue observado por Stella y col. (39) en un estudio realizado con el virus LCM.

No se conoce exactamente la metabolización del compuesto en las células sin embargo, es evidente que se requiere un nivel determinado pa-

ra que inhiba la replicación viral.

La actividad antiviral del BI, glucosamina y 2-deoxi-D-glucosa resultó ser dependiente de la concentración (Figura I).

El grado de inhibición producido por cada uno de ellos fue diferente y permitió seleccionar la concentración óptima de droga capaz de bloquear la replicación viral significativamente sin que produjera un efecto nocivo para los cultivos celulares.

Dichas concentraciones fueron de 75 ug/ml para el BI, 16 mM para la glucosamina y 10 mM para la 2-deoxi-D-glucosa.

La concentración de BI fue superior a la establecida por Stella y col. (39) quienes encontraron una inhibición significativa con concentraciones de 5 a 50 ug/ml de BI en células L.

La replicación del virus LCM resultó afectada en un 98 y 99,7% de inhibición respectivamente en presencia de dichas concentraciones.

Los mismos autores señalaron que el efecto antiviral del BI disminuyó entre un 25 y 50% cuando los cultivos celulares eran Vero y que la actividad virucida desapareció al utilizar cultivos de células BHK aún tratadas con 100 ug/ml (39).

Estos hallazgos apoyaron los datos obtenidos para el virus Junín ya que el sistema celular empleado correspondió a la línea continua Vero.

Los valores hallados para los derivados de la glucosa se encuentran entre los usados por otros investigadores en diferentes sistemas celulares y con otros virus. De acuerdo a los datos bibliográficos la concentración máxima no tóxica de glucosamina fue de 50 mM y se usó en células de embrión de pollo infectadas con Fowl Plague (30). Así mismo Dudd

y col trabajaron con 20 mM de glucosamina en células BHK infectadas con virus Sindbis (76).

La concentración de 2-deoxi-D-glucosa para un oncorina virus murino fue de 30 mM en las células NKR-K (células de riñón de rata normal transformada por el virus sarcoma murino Kirsten-leucemia KiMSV(KiMuLV) (31), aunque la concentración más frecuentemente usada fue la de 10 mM en la línea Hep-2 (línea continua humana) con los virus Respiratorio Sincicial, Parainfluenza 3 y Sarampión (32).

El virus asociado a las células en presencia de las concentraciones mencionadas anteriormente resultó afectado en forma similar en presencia de BI o glucosamina (Tabla 7).

Los datos del BI para el virus LCM en células L (39) indicaron igual grado de inhibición para el rendimiento extracelular como para el asociado a las células, concordando con los obtenidos en este trabajo.

La 2-deoxi-D-glucosa no afectó la producción de virus asociado a las células lo que señalaría que el proceso de brotación es bloqueado por la presencia de la droga.

Las curvas de multiplicación del virus extracelular en presencia de BI, 2-deoxi-D-glucosa y glucosamina (Figuras III y IV) mostraron que la síntesis viral se encontró afectada en todos los casos, correspondiendo la mayor inhibición a la glucosamina.

El resultado más sorprendente fue la ausencia total de partículas infecciosas en el medio extracelular de los cultivos infectados y tra-

tados con 16 mM de glucosamina en todos los tiempos ensayados.

La exactitud del método de titulación, unidades formadoras de placas bajo agar, empleado para evaluar los rendimientos virales permitió asegurar la conclusión anterior.

La determinación de los índices quimioterápicos in-vitro demostró la variabilidad entre los tres compuestos. De acuerdo a ellos la glucosamina cumpliría con una de las condiciones que debe reunir un buen quimioterápico.

MECANISMO DE ACCION DE LA GLUCOSAMINA

La glucosamina se sometió a un riguroso análisis analítico el cual demostró la ausencia de contaminantes, en especial de los cationes bivalentes de la primera serie de transición: Mn, Co, Ni, Fe, Cu y Zn (Tablas 1 y 2).

Levison y col. (16) trabajando con un virus oncogénico (Sarcoma de Rous) demostraron que el N-metil-isatin beta tiosemicarbazona en presencia de iones bivalentes era mucho más efectivo que actuando sólo. Logan y col. (17), describieron el mismo efecto para ese compuesto y los virus LCM y otros Arenavirus indicando que el ión cúprico (Cu^{+2}) era el de mayor actividad.

Fox y col. (15) investigaron la acción del ión cúprico con el mismo inhibidor en infecciones realizadas con virus ARN o ADN pertenecien

tes a los géneros Vesículo-, Lyssa-, Alpha-, Flavi-, Paramixo-, Influenza-Entero-, Orthopox- y Reovirus. En todos ellos se observó una rápida inactivación viral, postulando dichos autores que los iones cúpricos inactivaron por contacto directo la infectividad de dichas partículas pero ellas retuvieron sus propiedades antioénicas tales como la capacidad de hemoaglutinar o la actividad de neuroaminidasa del virus Influenza tipo A (15)(40).

Korant y col. (27) demostraron que los iones zinc (Zn^{+2}) bloquearon la replicación de diferentes Rhinovirus. El mecanismo propuesto fue la inhibición de la ruptura normal de los polipeptidos precursores virales. A través de este mecanismo los iones zinc también impidieron la multiplicación de los virus Encefalomiocarditis y Polio (78).

En nuestro caso la ausencia de contaminantes permitió asegurar que el efecto observado se debía exclusivamente a la acción de la glucosamina.

Las distintas cepas de virus Junín: XJ, XJC13 y Mones Cazón ensayadas simultáneamente (Tabla 3) demostraron que la sensibilidad a la glucosamina era una propiedad común a todas ellas y no una reacción específica con la cepa atenuada XJC13.

Fleming (33) investigando diferentes cepas de virus Senliki encontró una distinta susceptibilidad frente a la 2-deoxi-D-glucosa de las mismas.

La inactivación directa no fue la causa de la inhibición observada en los cultivos infectados con virus Junín y tratados con 16 mM de glucosamina (Tabla 9).

La incubación con diferentes concentraciones de droga antes de la infección no impidió la replicación viral. Este fenómeno también se observó con los virus Fowl Plague y Semliki Forest (27). Sin embargo cuando el aminoazúcar se agregó después de transcurridos varios ciclos de replicación viral se observó una disminución significativa de los rendimientos extracelulares (Figura V).

Los ensayos de reversibilidad indicaron que la droga debía permanecer siempre en el medio para no detectar partículas infecciosas y demostraron que el efecto de la glucosamina desapareció por lavado ya que a las cuatro horas de levantada la restricción se encontraron partículas virales infecciosas asociadas a las células y dos horas más tarde en los sobrenadantes de esos cultivos (Figuras VII y VIII).

Dado que se conoce que el ciclo viral del virus Junín es de aproximadamente de doce horas se concluyó que el virus inició su replicación en presencia de glucosamina pero quedó detenida en uno de los últimos estadios(47).

La reversibilidad de la glucosamina también fue observada por Hunter y col. (34) y por Kaluza y col.(27). Los primeros trabajando en cultivos de embrión de pollo transformados por la cepa Praga del subgrupo B del virus Sarcoma de Rous (PR-RSV-B) encontraron que la síntesis viral se

reestableció a las seis horas de retirada la droga.

El grupo de Kaluza señaló que luego del lavado de los cultivos tratados con glucosamina se reestableció la producción de hemoaglutininas y neuroaminidasa. Además observaron la formación de partículas (27).

Los precursores virales sintetizados en presencia de 16 mM de glucosamina mantuvieron su funcionalidad aún después de 96 horas de tratamiento (Figura IX A y B).

Este hecho significó no sólo la estabilidad de las estructuras sino que además demostró que la glucosamina no había afectado la viabilidad celular demostrada por la producción de viriones.

La glucosamina presentó un marcado efecto sobre la síntesis de ácido ribonucleico celular (Figura X). Estos datos concordaron con los publicados con Bekesi y col. (28) y por Scholtissek (29) quienes demostraron que la glucosamina reduce drásticamente el pool de UTP celular y que si además el medio contiene glucosa como fuente de energía interferiría con la activación de otros azúcares por el agotamiento de dicho pool (35).

Coto y col. (62) encontraron que la velocidad de síntesis del ARV en las células Vero infectadas con la cepa XJ013 aumenta durante las primeras doce horas del ciclo manteniéndose luego en los niveles normales de incorporación.

Los datos presentados en la Figura XI indicaron una mayor incorporación de uridina marcada en los cultivos infectados pero durante un período más breve, ocho horas.

Los cultivos infectados y tratados con 16 mM de glucosamina incorporaron un 30% de la radiactividad señalando un significativo efecto sobre la síntesis total de ARN.

La incorporación de metionina marcada demostró que la síntesis proteica total ocurrió normalmente en los cultivos infectados tratados o no con glucosamina (Figura XII) por lo que se concluyó que la droga no afectó dicha síntesis, sin embargo la producción de proteínas virales debió estar afectada como consecuencia de la inhibición de la síntesis de ARN.

Resultados similares se obtuvieron en fibroblastos de embrión de pollo infectados con virus Fowl Plague (35).

A pesar de la marcada acción de la glucosamina sobre la síntesis de ARN este efecto no sería el único mecanismo responsable de la inhibición observada .

El mecanismo de acción de la glucosamina sobre la multiplicación del virus Junín, de acuerdo a los resultados obtenidos, sería interferir con la etapa de síntesis y maduración viral.

Estas conclusiones se basaron en: el tratamiento durante distintos períodos con glucosamina (Tabla 10), en el efecto sobre la síntesis de macromoléculas y en los ensayos de reversibilidad.

El efecto de la glucosamina sobre la producción de virus infeccioso y partículas virales se complementó con estudios inmunológicos y de mi-

microscopía electrónica.

Los antígenos citoplasmáticos se visualizaron por la técnica indirecta de IF en células fijadas con acetona.

Las células infectadas en presencia de glucosamina mostraron la misma distribución de fluorescencia que los cultivos infectados sin tratamiento, confirmando que el virus Junín replicó en presencia de la droga (Fotografías 1, 2, y 3).

Como consecuencia del proceso de brotación y liberación de las partículas virales se detectan en la superficie de las células infectadas antígenos virales.

Las células infectadas sin fijar presentaron intensa fluorescencia en su periferia (Fotografía 4) mientras que las mismas células en presencia de glucosamina carecieron del antígeno de superficie (Tabla 14).

Kaluzza y col. (27) demostraron que los núcleos o los citoplasmas de células infectadas con el virus Fowl Plague en presencia de 10 mM de glucosamina sintetizaron los antígenos de la ribonucleoproteína y de la hemoaglutinina que se detectaron por IF.

Resultados similares a los obtenidos en esta investigación fueron presentados por Hunter y col. (34). Estos autores demostraron la inhibición de la formación del antígeno de superficie en presencia de 20mM de glucosamina en fibroblastos de embrión de pollo transformados por el virus Sarcoma de Rous.

Los cultivos infectados y tratados con glucosamina no liberaron par

tículas antigénicas ni físicas. Esto se estableció estudiando la capacidad antigénica de los sobrenadantes purificados de esos cultivos y por microscopía electrónica.

La titulación de los inmunosueros C y G señaló que en presencia de glucosamina, una dosis menor (10 mM), no se liberaron partículas antigénicas virales.

La morfología de los viriones de la familia Arenaviridae ha sido establecida por distintos autores (63-66).

Las partículas varían en tamaño y forma pero en su interior se encuentra un número variable de gránulos densos, los cuales parecerían ribosomas aunque son más grandes y más densos que los ribosomas celulares.

El estudio de microscopía electrónica reveló que los cultivos infectados sin tratamiento produjeron partículas cuyas características morfológicas correspondieron a las descritas anteriormente.

En los cultivos tratados con la droga no se observó ningún tipo de partícula ni asociada a las membranas celulares ni libre en el medio extracelular.

Estos resultados establecieron que no hubo formación de partículas en presencia del aminoazúcar.

Conclusiones similares fueron presentadas por Hunter y col. (34) que indicaron que en presencia de 20 mM de glucosamina no se produjeron partículas físicas.

Prochownik y col. (31) sin embargo, señalaron que la droga inhibió la

infectividad, en otro sistema oncogénico, pero no la liberación de partículas físicas.

En experimentos realizados con 2-deoxi-D-glucosa se encontró que la virulencia del virus Herpes Simplex era bloqueada por el compuesto pero que igualmente se liberaban partículas no infecciosas (36).

Todos estos hallazgos no se contradicen si se tienen en cuenta los tres efectos que los análogos de la glucosa producen como consecuencia del disturbio producido en la síntesis de las glicoproteínas:

- 1.- No se forman partículas físicas ni infecciosas (virus Fowl Plague (35), Semliki Forest (27) y Sarcoma aviarios (34).
- 2.- Se forman partículas físicas que contienen glicoproteínas incorrectas y en consecuencia resultan no infecciosas (virus Herpes Simplex (36)).
- 3.- Se forman partículas físicas que contienen glicoproteínas incorrectas pero que a pesar de ello son infecciosas (VSV (27)).

De acuerdo a estos tres caminos el efecto de la glucosamina sobre el virus Junín correspondería al primero de ellos.

El virus Junín posee seis polipéptidos estructurales de los cuales cuatro por lo menos son glicosilados (79).

La ausencia de partículas infecciosas en presencia de glucosamina indicaría que las glicoproteínas del virus juegan un papel importante en la capacidad infectante de los viriones.

Los resultados obtenidos in-vitro indicaron que la glucosamina y tal vez el BT serían quimioterápicos apropiados para combatir la FHA. Por esa razón se los ensayó in-vivo, en distintos animales de laboratorio.

El problema más difícil de resolver fue la elección del modelo a utilizar ya que el cobayo resulta extremadamente sensible a la administración de cualquier fármaco.

La segunda dificultad fue que en el modelo elegido, ratón de 20 días de edad inoculado con virus Tacaribe, el animal muere por conflicto inmunológico y no debido a una acción citopática directa del virus.

Los tratamientos realizados con BT no fueron satisfactorios porque el intervalo útil de droga resultó muy crítico y tal como había ocurrido con la amantadina en cobayos (8) una sobredosis exacerbó el curso y desenlace de la enfermedad.

Más desalentadoras fueron las pruebas realizadas con glucosamina aunque en este caso la droga no resultó tóxica.

La nulidad de los tratamientos hacen pensar que probablemente la causa se debió al bajo nivel de glucosamina en el organismo .

Independientemente de la vía de inoculación la glucosamina se metaboliza rápidamente en el hígado desapareciendo de la circulación en un tiempo breve. De esa forma no se obtendría la concentración necesaria para impedir la replicación viral.

Además podría suceder que la glucosamina no alcance los sitios de

replicación viral, que en la mayoría de los casos fue el cerebro por ser la vía intracerebral la más sensible a la infección.

Si estas fueran las causales cabría la posibilidad de ensayar distintos compuestos que en el organismo liberasen gradualmente glucosamina o quizás administrarla de alguna manera para que pueda llegar a los órganos donde ocurre la replicación del virus.

CONCLUSIONES

Estas investigaciones en conjunto permitieron conocer la acción de distintos antivirales sobre la multiplicación del virus Junín, agente causal de la FHA.

Los antivirales BI, 2-deoxi-D-glucosa y glucosamina quedan como armas útiles para el estudio del virus in-vitro.

La 2-deoxi-D-glucosa se puede usar para aclarar el mecanismo de la morfogénesis viral ya que inhibe la salida del virus de la célula pero no la síntesis intracelular.

Los hechos más sobresalientes de la acción de la glucosamina sobre la replicación del virus Junín en células Vero fueron:

- .-El tratamiento con la droga bloqueó en forma absoluta la formación de partículas virales infecciosas.
- .-A las cuatro horas de levantada la restricción se reasumió la síntesis de virus intracelular y dos horas más tarde se liberaron partículas infectantes completas al medio extracelular.
- .-La inhibición se produjo en un estadio anterior a la liberación esto se dedujo por la ausencia de antígeno de superficie y de partículas físicas.

Roberto Hernández

María Oller

R E F E R E N C I A S

- 1.- Davies W.L.;Grunert R.R.;Haff R.F.;Mac Garen J.W.;Neumayer E.M. ;
Paulshock M.;Watts J.C.;Wood P.R.;Hermann E.C and Hoffmann C.E.
Science 144,862,1964.
- 2.- Neumayer E. ;Haff R.F.;and Hoffmann C.E.
Proc.Soc. Exptl. Biol. Med. 119,393,1965.
- 3.- Maasab H.F. and Cochran J.
Science 145:1443,1964.
- 4.- Kato Jobuo and Eevers H.J.
Virology 37:632,1969
- 5.- Hoffmann C.E.;Neumayer E.M.
In Carter,W.A. ed. Selective Inhibitors of viral functions,
Cleveland,CRC Press,1973 pp 199.
- 6.- Welsh R.M.;Trowbridge R.S.;Kowalski J.B.;O'Connell C.M and Pfau C.J
Virology 45:number 3,679,1971
- 7.- Coto C.E.;Galello M.A. y Parodi A.S.
Rev.Asoc.Arg.Microb. 1,número 1,3,1969.
- 8.- Coto C.E.
Medicina (Buenos Aires) 32:número 1,23,1972.
- 9.- Pfau C.J.;Trowbridge R.S.;Welsh R.M.;Staneck L.D.;O'ConnellC.M.
J.Gen.Virol. 14:209,1972
- 10.- Aldrich F.E.;Hermann E.C.;Meier W.E.;Paulshock M.;Prichard W.W;
Snyder J.A and Watts J.C.

- J. of Med. Chemistry 14:number 6,535,1971
- 11.- Hoffmann G.S;Neumayer E.M.;Haff R.F. and Goldsby R.A.
J.Bacteriol. 90:632,1965
 - 12.- Jackson F.G;Kuldoon R.L. and Akers L.N.
Antimicrob. Ag. Chemother. 3:703,1964
 - 13.- Tsunoda A.,Massab H.F.;Cochran K.W. and Eveland W.C.
Antimicrob. Ag. Chemother. 5:53,1965
 - 14.- Rabinovich S.;Baldini J.P. and Bannister
Amer. J. Med. Science 267,328,1969.
 - 15.- Fox M.P.;Bopp L.H. and Pfau J.C.
Ann.N.Y. Acad.Sci. 284:533,1977
 - 16.- Levinson W.;Paras A.;Morris R.;Mikelens P.;Rengold G.;Kass G.
Levinson R.;Jackson J.
Virus Reseach 2nd INC-UCLA Symposium on Molecular Biology (Fox
G.P. and Robinson W.S.eds) Academic Press,NY 1973.
 - 17.- Logan J.C.;Fox M.P.;Morvan J.H.;Makohon A.M and Pfau C.J.
J. Gen. Virol. 28:271,1975.
 - 18.- Young L.;Yee K.M.;Makohon A.M.;Fox M.P. and Pfau C.J.
Interse. Conference Antimicrob.Ag.Chemother.,Abs. 236,1974.
 - 19.- Hollinshead A.C. and Smith P.L.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 123:54,1958
 - 20.- Eggers H.J. and Pamm I.
Annu. Rev. Pharmacol. 3:231,1966
 - 21.- Pfau C.J. and Camyre K.P.
Virology 35: 375,1968.

- 22.- Akihama S.; Okude H.; Sato K. and Iwabuchi S.
Nature (London) 217:562,1968.
- 23.- Schleicher J.B.; Aquino F.; Rueter A.; Roderick W.R. and Appell R.J.
App. Microbiol. 23:113,1972.
- 24.- Shipkoqitz N.L.; Bower R.R.; Schleicher J.B. ; Aquino F.; Appell R.J.
and Roderick W.R.
App. Microbiol. 23:117,1972.
- 25.- Stella J.P.; Michaelson J.; Dorfman S.L.; Morgan J.H. and Pfau C.J.
Antimicrob. Agen. and Chemoth. 6:754,1974.
- 26.- Kilbourne E.D.
Nature (London) 465:271,1959.
- 27.- Kaluza G.; Scholtissek C. and Rott R.
J.Gen.Virol. 14: 251,1972.
- 28.- Bekesi J.C.; Bekesi E. and Winzler R.J.
J.Biol.Chem. 244:3766,1969.
- 29.- Scholtissek C.
Europ.J.Biochem. 24:358,1971.
- 30.- Kaluza G.; Schmidt W.F.; Scholtissek C.
Virology 54:179,1973.
- 31.- Prochownik E.; Fanem S. and Kirsten W.
J. of Virol. 15:1323,1975
- 32.- Hodes D.S.; Schnitzer T.J.; Kalica A.R.; Camargo E. and Chanock R.M.
Virology 63:201,1975.
- 33.- Fleming D.
J.Gen.Virol. 19:353,1973.

- 34.- Hunter E.;Früis R.R.and Vogt F.K.
Virology 58:449,1974.
- 35.- Klent H.D.;Scholtissek C. and Rott R.
Virology 49:723,1972.
- 36.- Courtney R.J.;Steiner S.M. and Beyesh-Melnick
Virology 52:447,1973.
- 37.- Boxaca M.;Parodi A.S.;Rugiero H. y Blay R.
Rev.Soc.Arg. Biol. 37:170,1961.
- 38.- Marino Aguirre G.F.
La Semana Médica 641,abril,1973
- 39.- Stella J.P.;Yankaskas K.D.;Morgan J.H.;Fox J.P. and Pfau C.J.
Antimicrob. Agen. and Chemoth. 6:747,1974.
- 40.- Pfau C.J.
Medicina (Buenos A^{res}) 37:supl. 3,219,1977.
- 41.- Parodi A.S.;Greemoay D.J.;Rugiero H.R.;rivero E.;Frigerio M.;
Mettler N.E.;Garzón F.;Boxaca M.;Guerrero L.B.de y Nota V.R.
Día Médico 30:2300,1958
- 42.- Pirosky I;Zuccarini J.;Molinelli E.A.;Pietro A;Barrera Oro J.G.
y Martini P.
Orient. Médica 8:171,1959.
- 43.- Schwartz E.R.
Medicina (Buenos Aires) 30: supl. 1,8,1970.
- 44.- Sabattini M.S.
Medicina (Buenos Aires) 37:supl. 3,1978

45.- Martínez Peralta L.

Tesis Facultad de Ciencias Médicas Univ.Nacional de la Plata 1977.

46.- Guerrero L.B.de

Medicina (Buenos Aires) 37:supl.3,252,1977.

47.- Coto C.E. and de Vonberger I.D.

Arch.ges.Virusforsch 27:307,1969.

48.- Mettler N.;Buckley S.W.;Casals J.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 107:684,1961.

50.- Guerrero L.B.de;Weissenbacher M.;Parodi A.S.

Medicina (Buenos Aires) 29:1,1967

51.- Martínez Segovia Z.de;HolsteinB.A. y Grazioli F.

Ciencia Invest. 23:35,1967.

52.- Reed L.J. and Muench H.A.

Ann.J.Hyg. 27:493,1938.

53.- Pedersen T.

J.of Virology 6:414,1970.

54.- Help G.I.;Coto C.E. y Kharshevski L.

Medicina (Buenos Aires) 30:supl. 1,15,1970.

55.- Webb P.A.;Johnson K.W.;Mackenzie S.B.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 130:1013,1969.

56.- Rovozzo G.C. and Burke C.V.

A manual of Basic Virological Thecnics Prentice-Hall,Inc.
Englewood Cliff,NY.

57.- Rutter G. and Gschwender H.H.

In Lymphocytic Choriomeningitis and other Arenaviruses 51,

Edited by F. Lehmann-Grube, Berlin, Heidelberg, New York. Springer Verlag.

58.- Parker R.C.

Métodos de cultivos de los tejidos y las células. Atika. Madrid 1966.

59.- Lowry O.H.; Rosebrough N.Y.; Farr A.L. and Randall R.D.

J. Biol. Chem. 193, 265, 1951.

60.- Coto C.E.

Progress in Medical Virology 19:127, 1974.

61.- Rhin J.L.; Simizu B.; and Wiebenga N.H.

Arch. ges. Virusforschung 21:243, 1967.

62.- Coto C.E.; de Vombergar M. y Tkacevskij L.Z.

Medicina (Buenos Aires) 30:supl. 1, 38, 1970.

63.- Murphy F.A. and Whitfield S.G.

Bull. W.H.O. 52:409, 1975.

64.- Mannweiler K and F. Lehmann-Grube

In F. Lehmann-Grube (Ed.) Lymphocytic Choriomeningitis virus and other Arenaviruses. p37, Springer-Verlag, Berlin 1973.

65.- Murphy F.A.; Webb P.A.; Johnson K.M.; Whitfield S.G.

J. of Virol. 4:535, 1969.

66.- Murphy F.A.; Webb P.A.; Johnson K.M.; Whitfield S.G. and Chappell W.

J. of Virol. 6:507, 1970

67.- Nota N.R.; Frigerio M.J.; Guerrero L.B. de; Nejamkis M.R.

Medicina (Buenos Aires) 29:171, 1969

- 68.- Boxaca M.C.; Giovannello O.A.; Vota N.R.; Nejankis M.R.; Guerrero L.B. de; Frigerio M.J.
Rev. Asoc. Arg. Microbiol. 5:2, 1973.
- 69.- Boxaca M.C.; Guerrero L.B. de; Savy V.
Arch. ges. Virusforsch. 40:10, 1973.
- 70.- Taratuto A.L.; Pkaczewski L.Z. de; Vota N.R.; Nejankis M.R.; Giovannello O.A.
Arch. ges. Virusforsch. 43:173, 1973
- 71.- Nejankis M.R.; Giovannello O.A. y Vota N.R.
Rev. Asoc. Arg. Microbiol. 9:35, 1977
- 72.- Bruno-Lobo G.G.
Anls. de Microbiol. 15:1, 1968
- 73.- Nejankis M.; Weissenbacher M. y Catello J.
Medicina (Buenos Aires) 32:supl. 3, 121, 1977.
- 74.- Chastel C.
Ann. Inst. Pasteur 122:1193, 1972.
- 75.- Coto C.E. y León A.E.L.
Medicina (Buenos Aires), en prensa 1978.
- 76.- Dudd and Schlensiger
J. of Virol. 15:416, 1975.
- 77.- Korant B.D.; Kauer J.C. and Butterworth B.E.
Nature (London) 248:588, 1974
- 78.- Butterworth B.E. and Korant B.D.
J. of Virol. 14:282, 1974.
- 79.- Martínez Sexovia Z.E.; De Mitri M.; Grau O.; Añón M.C.; Franze-Fernandez
Medicina (Buenos Aires) 32:supl. 3, 18, 1977.